

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE
LYON

Année 1978 - N° 2

LOCALISATION DES ENZYMES DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE
DES MITOCHONDRIES DE CŒURS DE PORCS
CLINIQUEMENT NORMAUX

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON
(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 5 Janvier 1978
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Hammou MAÏROUCH

Docteur en Biochimie





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554217_0002

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE

LYON

Année 1978 - N°

LOCALISATION DES ENZYMES DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE
DES MITOCHONDRIES DE CŒURS DE PORCS
CLINIQUEMENT NORMAUX

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON

(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 5 Janvier 1978

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Hammou MAÏROUCH

Docteur en Biochimie



PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE
DE LYON

- DIRECTEUR Monsieur le Professeur FROGET
- DIRECTEURS HONORAIRES..... Messieurs les Professeurs TAPERNOUX, FLORIO

PROFESSEURS

1° - Pharmacie et Toxicologie..... M. LORGUE
2° - Anatomie descriptive - Extérieur - Anatomie appliquée..... M. BARONE
3° - Physiologie - Thérapeutique..... M. BOST
4° - Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique..... M. TISSEUR
5° - Hygiène et Industrie des Aliments d'Origine Animale..... M. FLACHAT
6° - Parasitologie et Maladies Parasitaires..... M. EUZEBY
7° - Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores - Législation Vétérinaire..... M. FONTAINE
8° - pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-Cour..... M. COTTEREAU
9° - Technique chirurgicale - Pathologie chirurgicale..... M. COULON
10° - Obstétrique - Pathologie de la Reproduction..... M. BERTRAND
11° - Pathologie générale - Microbiologie - Immunologie..... M. OUDAR
12° - Ethnologie - Zootechnie - Economie Rurale..... M. FROGET
13° - Botanique appliquée - Agronomie - Alimentation..... M. WOLTER
14° - Physique et Chimie biologiques et médicales.....
15° - Maladies Contagieuses - Zoonoses - Législation Sanitaire..... M. JOUBERT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. CHANTEGRELET, DELATOUR, DESCHANEL, JEAN-BLAIN, LAPRAS, LE NIHOUANEN.

MAITRES DE CONFERENCES

MM. BOIVIN, GASTELLU, MOUTHON.

M. PRAVE.

MAITRES-ASSISTANTS AGREGES

MAITRES-ASSISTANTS

Mme CHAUVE, MM. FRANCK, FAU, GARNIER, GEVREY, GOUY, KECK, LABE, Mlle LAVAL, M. LEGFAY, Mme RACHAIL, M. RICHARD.

ASSISTANTS

MM. BELL, BEZEAUD, CHEVRIER, Mlle COURSAT, MM. DEGUELLE, DEMONT, DESCOTES, EUZEBY, Mlle FLEURY, GENIN, MOREAU, NEYRET, PERROTIN, Mme SIMONET, M. SOTTIAUX.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. le Professeur...LOUISOT... de la Faculté de Médecine.
Premier assesseur : M. le Professeur...MOUTHON... de l'Ecole Nationale Vétérinaire.
Deuxième assesseur : M. le Professeur...POST..... de l'Ecole Nationale Vétérinaire.

L'Université Claude Bernard (Médecine-Pharmacie) de LYON et l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.

A MA FEMME

A MON FILS

A MES PARENTS

Qu'ils trouvent ici le témoignage de
mon affection et de ma très profonde gra-
titude.

A MES FRERES

A TOUTE MA FAMILLE

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUISOT
de la Faculté de Médecine de Lyon

Qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence du Jury
de notre thèse.

Hommages respectueux.

A la mémoire de MONSIEUR LE PROFESSEUR MAGAT

Pour les conseils qu'il nous a
prodigués au début de ce travail
et l'accueil toujours bienveillant
qu'il nous a réservé.

Témoignage de reconnaissance et
de profonde estime.

A MONSIEUR LE MAITRE DE CONFERENCES MOUTHON
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

Qui a bien voulu prendre la suite
de notre travail sous sa responsabilité

Qui nous a conseillés et guidés pour
l'achever

Sincères remerciements.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOST
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui a bien voulu accepter de juger
ce travail et de faire partie de notre
jury de thèse.

Hommages respectueux.

Il est pour nous un agréable devoir de remercier :

- le Professeur Danielle Gautheron de l'ordre National du Mérite qui nous a accueilli dans son Laboratoire de Biochimie Dynamique et a veillé personnellement sur notre formation.

Avec l'expression de notre gratitude

- Mademoiselle Catherine Godinot chargée de Recherches au CNRS qui nous a appris les techniques de base en Biochimie et nous a donné beaucoup de son temps
- la direction des Laboratoires Vétérinaires pour les services qu'elle nous a gracieusement rendus.

INTRODUCTION

Les myopathies métaboliques ou d'origine nutritionnelle affectent plusieurs espèces animales : ruminants (1), équins (2), oiseaux (3), et porcins (1).

Elles sont souvent la conséquence de carences ou de subcarences en vitamine E et en sélénium. Les phénomènes dégénératifs qui les caractérisent peuvent atteindre indifféremment les muscles squelettiques et le coeur. Plusieurs hypothèses ont été émises pour éclaircir leur étiologie (24). Leur pathogénie semble faire intervenir des modifications de la membrane interne des mitochondries qui contiennent les enzymes responsables du fonctionnement de la chaîne respiratoire.

En effet, l'absence de la vitamine E et du Sélénium produit des altérations de structure des membranes, qu'elles soient cellulaires comme celles de la fibre musculaire, ou sub-cellulaires, comme celles des mitochondries.

Les membranes mitochondriales renferment des enzymes et des phospholipides qui sont indispensables à leur fonctionnement. Les enzymes oxydent les substrats physiologiques et interviennent dans la récupération de l'énergie. L'apport de la vitamine E et du Sélénium s'oppose à l'oxydation des phospholipides donc au développement de la peroxydation dont les effets néfastes retentissent sur les activités enzymatiques.

Pour mieux connaître la pathogénie des myopathies nutritionnelles et en particulier le rôle protecteur du sélénium et de la vitamine E sur les enzymes, la structure fondamentale de la membrane mitochondriale interne mérite d'être étudiée.

Il convient de s'intéresser à ses composantes protéiques, qu'elles soient structurales ou fonctionnelles, à sa composition lipidique, donc à son organisation normale avant d'étudier les perturbations biochimiques apparaissant lors d'insuffisance en anti-oxydants naturels et d'essayer d'expliquer les mécanismes d'action de ces derniers.

C'est pourquoi nous avons d'abord rappelé les rôles de la vitamine E et du sélénium sur l'intégrité membranaire et la topographie naturelle de la membrane mitochondriale interne. Nous avons volontairement insisté sur le complexe enzymatique capable de synthétiser l'adénosine triphosphate (A.T.P.). Il s'agit de l'ATPase dont l'une des propriétés est sa sensibilité à l'oligomycine d'où son nom d'O.S. ATPase : Oligomycine-Sensible ATPase.

Nous nous sommes ensuite appliqués à obtenir les membranes mitochondriales des coeurs de porcs cliniquement normaux, à les soumettre à la sonication, à l'hydrolyse par la trypsine et à isoler l'enzyme responsable de la récupération de l'énergie.

Nous avons cherché à préciser les orientations des particules submitochondriales que nous avons préparées et les localisations le long de la chaîne respiratoire des enzymes choisies pour cette étude.

C'est pourquoi nous envisagerons successivement :

- l'étude bibliographique du sujet
- le matériel et les méthodes utilisées
- les résultats obtenus
- la discussion
- les conclusions.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette première partie, nous étudierons :

- la conservation de l'intégrité membranaire par apport des anti-oxydants naturels: vitamine E et Sélénium.
- l'organisation normale de la membrane mitochondriale interne.
- l'organisation spatiale du complexe O.S. ATPase dans la membrane mitochondriale interne.

PREMIER CHAPITRE

CONSERVATION DE L'INTEGRITE MEMBRANAIRE

PAR APPORT DES ANTI-OXYDANTS NATURELS :

VITAMINE E ET SELENIUM

I - IMPORTANCE DES ANTI-OXYDANTS NATURELS SUR LA STRUCTURE MEMBRANAIRE

Les anti-oxydants sont des substances capables de ralentir la vitesse d'oxydation de corps auto-oxydables.

Ils ont des rôles à jouer aussi bien sur le plan biologique que sur le plan thérapeutique.

- Sur le plan biologique, les phénomènes d'oxydation sont indispensables au fonctionnement cellulaire. Les lipides polyinsaturés jouent un rôle prépondérant dans la composition des membranes cellulaires, du réticulum endoplasmique et des mitochondries, lesquelles contiennent, seules, l'ensemble des transporteurs de la chaîne respiratoire. La peroxydation constitue le processus d'oxydation qui détériore ces lipides insaturés. Les radicaux libres ainsi produits entraînent des lésions des membranes et des organites intra-cellulaires, des protéines, des enzymes qui subissent des scissions, ou des polymérisations. Au total, dans la plupart des tissus, des anti-oxydants naturels veillent à l'équilibre cellulaire lipoperoxydation-antioxydation (4).

- Sur le plan thérapeutique :

* la vitamine E ou α -tocophérol est l'un des rares anti-oxydants pouvant entrer dans la cellule et participer à la régulation de ces processus.

* la vitamine C intervient elle aussi dans un grand nombre de réactions et se conduit comme un agent réducteur. Elle potentialise l'efficacité de la Vitamine E.

* L'administration du sélénium empêche l'apparition de la nécrose hépatique expérimentale du rat, de la diathèse exsudative du poulet et de la myopathie des agneaux et des veaux. Le rôle biochimique du sélénium est probablement lié à celui de la vitamine E.

- D'autres anti-oxydants tels que le glutathion, la cystéine, les protéines à groupe sulfhydrile ont eux aussi une action thérapeutique.

Il apparaît donc nécessaire d'apporter à l'organisme par une alimentation judicieuse, outre la vitamine C, trois éléments : la vitamine E, le Sélénium et les acides aminés soufrés, pour prévenir l'oxydation des acides gras et maintenir l'intégrité des membranes, qu'elles soient cellulaires, comme celles de la fibre musculaire, ou subcellulaires, comme celles des mitochondries.

II - LA SYNERGIE ENTRE LA VITAMINE E ET LE SELENIUM

A) La synergie entre la vitamine E et le Sélénium a été démontrée dans plusieurs espèces animales.

a) Chez les Bovins

Des chercheurs britanniques (5) rapportent les observations cliniques, biochimiques et pathologiques faites durant une manifestation de myopathie aigue chez les bovins d'un an, après mise au pâturage de printemps. L'âge des bovins atteints varie de 13 à 20 mois et leur poids de 225 à 320 kgs.

Le syndrome clinique décrit semble être un trouble des muscles squelettiques, associé à l'avitaminose E, avec une mortalité située entre 25 et 50 % des animaux atteints. Cette conclusion s'appuie sur une évaluation des ingestions de vitamine E et de sélénium, sur une étude histopathologique des cas observés et sur la réponse à l'administration de sélénium et de vitamine E.

Il y a d'importants facteurs susceptibles de favoriser l'apparition éventuelle de la maladie.

On considère généralement qu'un niveau adéquat de sélénium disponible dans les aliments pour animaux se situe entre 0,1 et 0,2 ppm (5). A des taux de sélénium ne dépassant pas 0,05 à 0,1 ppm, la teneur en tocophérol peut devenir un important facteur pour prévenir la myopathie nutritionnelle chez le veau et l'agneau.

b) Chez les Volailles

D'autres auteurs comme Combs, G.F et coll (6) ont confirmé que la vitamine E et le sélénium ne sont pas interchangeables et que l'un ne peut remplacer l'autre. Ils sont tous les deux nécessaires pour protéger les membranes cellulaires contre la peroxydation chez le poulet.

Le besoin en vitamine E en présence d'un approvisionnement correct en sélénium, ainsi que la quantité nécessaire de cet oligo-élément en présence d'un apport suffisant de vitamine E ont été déterminés chez des poulets carencés en cette vitamine. On distribue une ration semi-purifiée à faible teneur en sélénium et en vitamine E. L'inhibition de la peroxydation stimulée par l'acide ascorbique in vitro dans les microsomes du foie est employée comme paramètre. Les autres critères retenus sont la croissance et l'efficacité d'utilisation de la vitamine E de la ration sous forme de tocophérols dans le plasma.

Le taux de sélénium nécessaire pour inhiber la peroxydation est de 0,06 ppm (sous forme de Na Se O_3). Les résultats obtenus à partir de tous ces critères (inhibition de la peroxydation, croissance, utilisation de la vitamine E) concordent de façon satisfaisante.

Ces travaux montrent clairement que l'effet de protection du sélénium contre la peroxydation n'est pas dû à l'augmentation du taux plasmatique de tocophérols.

c) Chez les Porcins

Cette interaction synergique est controversée chez les porcins. Selon des travaux effectués à l'Université d'Iowa (9) des injections intramusculaires hebdomadaires de sélénium et (ou) de vitamine E, ont permis de prévenir le développement de lésions du foie et des muscles cardiaque et squelettiques et la mort chez les jeunes porcs recevant une ration carencée en vitamine E-sélénium. Le syndrome de carences en vitamine E et en sélénium a été étudié sur un total de 69 porcs (9).

D'après certains travaux, c'est le sélénium plutôt que la vitamine E, qui joue un rôle important dans la prévention du syndrome de carence en vitamine E-sélénium. D'autres chercheurs ont indiqué aussi que l'addition de sélénium aux rations carencées en cet élément et en vitamine E protégeait contre le développement des lésions hépatiques et cardiaques, mais non contre les lésions des muscles squelettiques. Les résultats des chercheurs de l'Université d'Iowa concordaient avec des travaux antérieurs montrant que la supplémentation en sélénium ou en Vitamine E avait la même efficacité pour prévenir le développement des lésions du foie et des muscles cardiaque et squelettique chez les porcs recevant une ration carencée en vitamine E et sélénium.

B) Influence de la supplémentation en vitamine E et Sélénium ~~sur~~ des femelles gestantes.

Les effets de la supplémentation en vitamine E et en sélénium ont également fait l'objet d'études chez les femelles gestantes et les ruminants carencés.

La vitamine E et le sélénium peuvent être administrés à la mère pour prévenir la dystrophie musculaire chez le veau et l'agneau.

JENKINS. K.J. et Coll ont effectué des expériences sur des vaches et des brebis. (7)

Les résultats obtenus montrent que l'addition de sélénium (14,8 ppm) et de vitamine E (2 700 mg par kg) dans les suppléments minéraux distribués "ad libitum" aux animaux durant les deux derniers tiers de la gestation et en début de lactation est efficace pour prévenir la dystrophie musculaire nutritionnelle chez la progéniture. On a estimé que l'ingestion du supplément minéral correspondait à 0,07 ppm de sélénium et 13,7 mg de vitamine E par kg de ration totale pour les vaches, de 0,09 ppm

de sélénium et 17,6 mg par kg de vitamine E pour les brebis.

Tontis, A. et MARTIG J. recommandent, en particulier durant l'hiver, les mêmes doses (15 ppm de sélénium et 2 700 mg par kg) incorporées dans les suppléments minéraux distribués "ad libitum" (8)

La question se pose de savoir quelle peut être l'influence d'un supplément minéral additionné de vitamine E et de sélénium sur les taux de sélénium des tissus chez les ruminants recevant un fourrage qui fournit une quantité correcte de cet oligo-élément. Les animaux carencés en sélénium retiennent cette substance en plus grande quantité que les sujets ayant bénéficié d'un approvisionnement normal ou en excès. D'autre part, l'excrétion de sélénium organique est rapide chez les animaux normalement approvisionnés. Il est donc hautement improbable que la supplémentation en sélénium puisse entraîner chez ces derniers des niveaux excessifs de l'oligo-élément. On peut dire que la supplémentation en sélénium et vitamine E par l'intermédiaire d'un composé minéral est un moyen pratique de prévenir les dystrophies musculaires nutritionnelles.

III - HYPOTHESES SUR LE MODE D'ACTION CELLULAIRE DU GROUPE

VITAMINIQUE E :

a) L'efficacité biologique des tocophérols

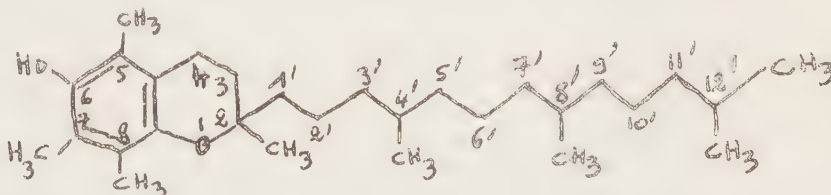
il existe plusieurs dérivés du tocol et du tocotriénol qui manifestent une activité vitaminique E.

Leurs activités sont extrêmement variables suivant les sources alimentaires.

Le tableau suivant représente les différentes formes de tocophérol, leurs activités relatives et leur origine.

Formes de tocophérol	Activité relative	Sources principales
alpha	100	Germes de blé-luzerne
bêta	35	Germes de blé
gamma	1	maïs
delta	1	soja
epsilon	5	son
zêta	30- 100	riz-orge
êta	1	riz

1 unité internationale (U.I.) = 1 mg d'acétate de D.L. tocophérol de formule :



α - tocophérol est le plus actif. On le trouve en quantités relativement importantes dans les plantes vertes.

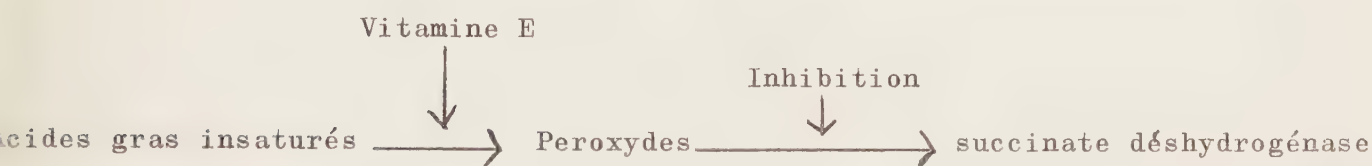
b) L'effet protecteur de la vitamine E vis à vis des membranes des cellules et des organites intra-cellulaires.

Au niveau cellulaire, la carence en Vitamine E se traduit par une modification membranaire. Deux hypothèses ont été énoncées :

- Selon TAPPEL (10), une carence en Vitamine E entraîne la dégradation des Acides gras insaturés entrant dans la composition lipidique des membranes et la formation de peroxydes et de radicaux libres. La Vitamine E apparaît comme

un véritable capteur de radicaux libres (11). Ceux-ci toxiques pour les enzymes cellulaires, induiraient la destruction membranaire. Ce facteur anti-oxydant assure donc la protection des membranes en bloquant les sites d'oxydation sur les acides gras polyinsaturés et en évitant la formation de peroxydes.

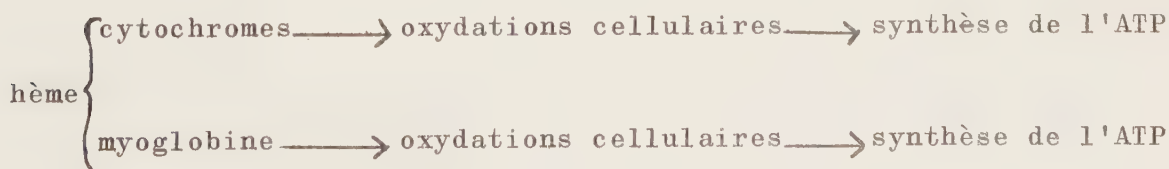
Au niveau des systèmes enzymatiques cellulaires, la Vitamine E agit sur les enzymes de la chaîne respiratoire comme sur la succinate déshydrogénase suivant le schéma simplifié (12)



Ceci entraînerait une altération des mécanismes membranaires et du métabolisme énergétique.

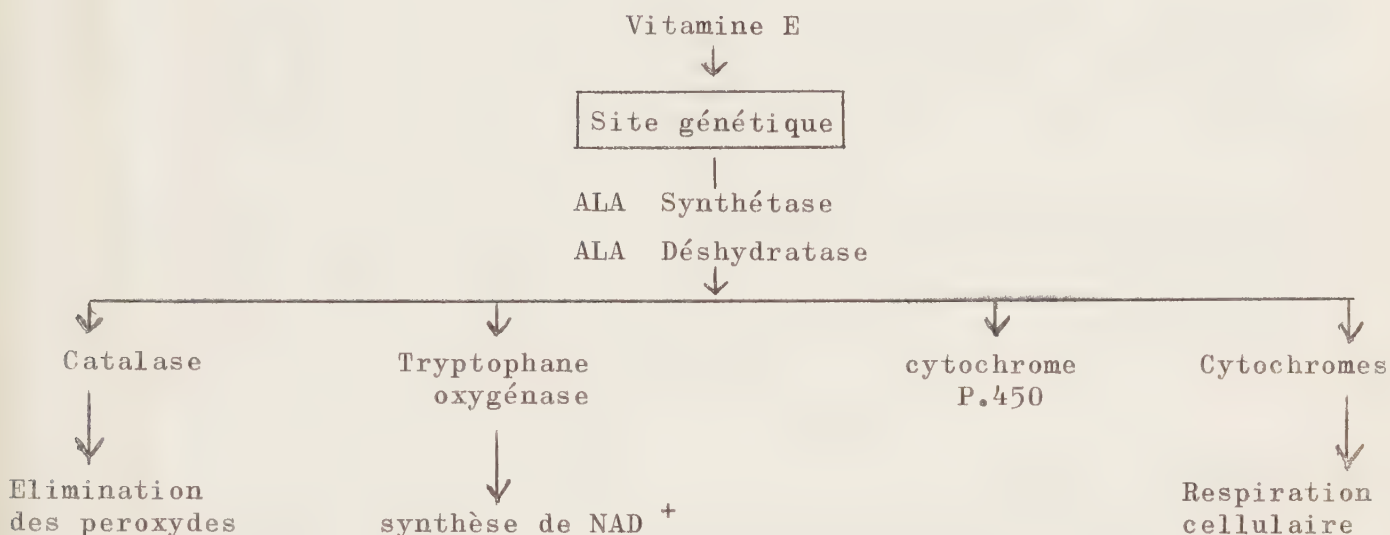
La vitamine E intervient soit par le maintien de la structure de la membrane interne des mitochondries, soit par une participation directe dans la chaîne respiratoire, certains auteurs (13) ayant fait remarquer son analogie structurale avec le co-enzyme Q (13) qui participe aux oxydations cellulaires et à la production de l'énergie (ATP) :

Le taux des cytochromes diminue lors de carence en vitamine E et redevient normal lorsqu'on corrige la carence. Les tocophérols seraient alors impliqués dans la synthèse de l'hème, aussi bien des cytochromes que de l'hémoglobine, et dans l'élaboration des acides nucléiques (14). Le rôle de la vitamine E au niveau des processus d'oxygénation cellulaire semble donc avoir une action sur la synthèse des cytochromes de la chaîne respiratoire où se produit l'élaboration de l'ATP :



La figure empruntée à NAIR précise ce que nous venons d'exposer sur les diverses actions de la Vitamine E.

Effets de la carence en vitamine E selon NAIR (15)



ALA : Acide aminolevulinique, précurseur des porphyrines donc intermédiaire de la biogénèse de l'hémoglobine et des autres chromoprotéides porphyriniques.

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide ; transporteur et accepteur de H⁺ pour certaines déshydrogénases.

IV - HYPOTHESE SUR LE MODE D'ACTION CELLULAIRE DU SELENIUM

Le sélénium entre dans la composition de la glutathion peroxydase. Ce fait a été découvert sur les globules rouges du rat (16). Chez les poulets dont la ration contient une quantité correcte de Sélénium, le niveau de l'enzyme reste élevé. Cependant ce dernier tombe à zéro en l'espace de 5 jours chez les poussins recevant une ration carencée en Sélénium.

La glutathion peroxydase, qui comporte quatre atomes de Sélénium par molécule de protéine (17), joue également un rôle de protection vis à vis des membranes des cellules et des orga-

nites subcellulaires : mitochondries, microsomes et lysosomes. Elle les protège en détruisant les peroxydes (18) et les radicaux libres (19).

La Vitamine E agit comme un anti-oxydant liposoluble, intracellulaire, spécifique, probablement lié à la membrane, tandis que le Sélénium catalyse la réduction des peroxydes dans la phase aqueuse de la cellule (6). On peut dire qu'en présence d'acides aminés soufrés et de la glutathion-peroxydase, le sélénium assure la protection des membranes.

Lors de carence en Sélénium, la protection n'est plus assurée et les fibres musculaires sont les premières atteintes par la dégénérescence cireuse de Zenker (20) avant la phase réactionnelle inflammatoire. La dégénérescence peut atteindre :

- le système musculaire locomoteur
- le coeur et le diaphragme

Des travaux et des enquêtes de LAMAND (21) menées en France, ont montré que les myopathies des ruminants semblent beaucoup plus relever d'une carence en Sélénium que d'une avitaminose E. Les interactions biochimiques entre Sélénium, Tocophérols et acides gras polyinsaturés, par exemple dans le tissu musculaire, sont encore mal connues. La démonstration que le Sélénium est une partie intégrante de la peroxydase du glutathion, dans les hématies en particulier, renforce l'hypothèse d'une fonction bien définie et articulée de ces trois catégories de substances dans les oxydo-réductions cellulaires (13).

En résumé, on peut admettre que l'état de carence soit en Vitamine E, soit en Sélénium, soit en ces deux facteurs, favorise la formation des peroxydes à partir des acides gras insaturés. Ces peroxydes inhibent les enzymes de la chaîne respiratoire ; cela entraîne finalement, quel que soit le point d'impact précis, un ralentissement du processus respiratoire cellulaire, donc de la production d'A.T.P. (22).

On comprend alors que l'effort musculaire, surtout s'il est soudain, entraînant une augmentation notable des besoins en A.T.P., place la cellule dans un état de "carence profonde en A.T.P.", induit la lésion de la structure cellulaire, commencée par une augmentation de la perméabilité du sarcolemme et poursuivie par la dégénérescence complète de la cellule (22).

V - MANIFESTATIONS CLINIQUES DE L'AVITAMINOSE E ET DE LA CARENCE
EN SELENIUM

Les activités d'intervention des anti-oxydants étudiés sont liées à la biochimie moléculaire. Elles déterminent finalement, les signes cliniques en cas de subcarence ou de carence. Le rôle selon lequel, la vitamine E assure la protection membranaire, expliquerait peut-être la diversité des troubles et symptômes liés à l'avitaminose. Chez les bovins, porcins et les volailles, plusieurs maladies sont reliées à une déficience en tocophérols, et en sélénium, en particulier les myopathies.

Elles sont fréquentes chez les jeunes animaux, nous les résumons dans le tableau suivant :

SYMPTOMES	ESPECES PRINCIPALEMENT ATTEINTES
"Maladie du muscle blanc" (7,23)	} Toutes espèces, surtout veau, agneau chevreau poulet.
"Maladie du coeur rond"	
Myopathie squelettique	dindon - canard (3)
"Maladie du coeur muriforme"	Jeune bovin de boucherie (1) } Porc
(Mort brutale) (24)	
(Viandes exsudatives) (25)	

DEUXIEME CHAPITRE

ORGANISATION NORMALE

DE LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE INTERNE

I - DIFFERENTS MODELES DE STRUCTURE DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES

Plusieurs modèles hypothétiques sur l'organisation moléculaire des membranes biologiques ont été formulés. DANIELLI et DAVSON | 26 | ont proposé un modèle où la membrane serait constituée d'une double couche lipidique intercalée entre deux feuillettes protéiniques. Quant au modèle proposé par SINGER | 27 |, il s'agit d'un schéma asymétrique où la membrane est constituée d'une double couche de phospholipides dans laquelle baignent des protéines globulaires.

Au microscope électronique les membranes mitochondriales présentent des caractéristiques morphologiques très distinctes qui permettent de les identifier.

La membrane externe se distingue de la membrane interne par sa composition. Elle se caractérise par sa richesse en lipides, avec une faible teneur en cardiolipine et par son équipement enzymatique. D'autre part, la membrane externe est librement perméable aux petites molécules, mais elle est imperméable aux plus grosses molécules. | 28 |

La membrane interne est de structure et de composition beaucoup plus complexes. Elle présente des invaginations vers l'intérieur appelées crêtes qui varient en nombre et en forme suivant leur origine tissulaire. D'après FERNANDEZ-MORAN | 29 |, ces crêtes portent des particules élémentaires ou

"oxysomes". Selon les mêmes auteurs, ces dernières contiennent des enzymes respiratoires. Mais, d'après RACKER et son équipe | 30 |, ces particules ou "knobs" pourraient être identifiées au facteur ATPase-F₁.

II - MOYENS D'ETUDE DE L'ORGANISATION DE LA MEMBRANE INTERNE

1) Méthodes de préparation des particules submitochondriales :

La préparation de plusieurs types de particules submitochondriales a permis d'étudier l'organisation de la membrane mitochondriale interne. Ces particules peuvent être de polarité normale ou de polarité inversée. On peut classer les méthodes de préparation de ces particules en plusieurs catégories :

- Méthode basée sur l'utilisation des moyens mécaniques : sonication. | 31 |

- Méthode basée sur les propriétés chimiques des membranes : digitonine. | 32, 33 |

- Méthode basée sur l'emploi des agents chimiques : KC1, KOH.

Les différences observées entre les particules soniquées et les "digitonine-particules" servent de support expérimental pour déterminer la distribution des composantes protéiques, enzymatiques et lipidiques sur l'une ou l'autre face de la membrane.

2) Moyens d'étude :

Nous exposerons les plus connus et les plus employés :

- Extraction sélective

- Dégradation enzymatique

- Méthode immunologique

- Méthode d'accessibilité de petites molécules non pénétrantes aux composantes de la membrane interne.

- Cryoclivage et microscopie électronique

a) Extraction sélective

Les solutions d'urée, d'acide acétique, de KCl dilué ou concentré ou la sonication douce permettent d'extraire facilement les protéines extrinsèques.

Les sonications puissantes, les détergents, les solvants permettent d'extraire les protéines intrinsèques des membranes.

b) Dégradation enzymatique

Hydrolyse protéolytique par la trypsine : JUNTTI et al | 34 | ont montré que les transhydrogénases sont localisées superficiellement à proximité de l'espace matriciel de la mitochondrie. L'ATPase sensible à l'oligomycine et la NADH oxydase ne sont pas touchées par la trypsine. Ils ont également montré que les sous-unités protéiques sont situés sur la face externe des particules inversées où l'enzyme F_1 est localisée.

c) Méthode immunologique

- Anticorps anticardiolipides :

Ces anticorps ont la capacité de s'associer aux têtes polaires des molécules de cardiolipine.

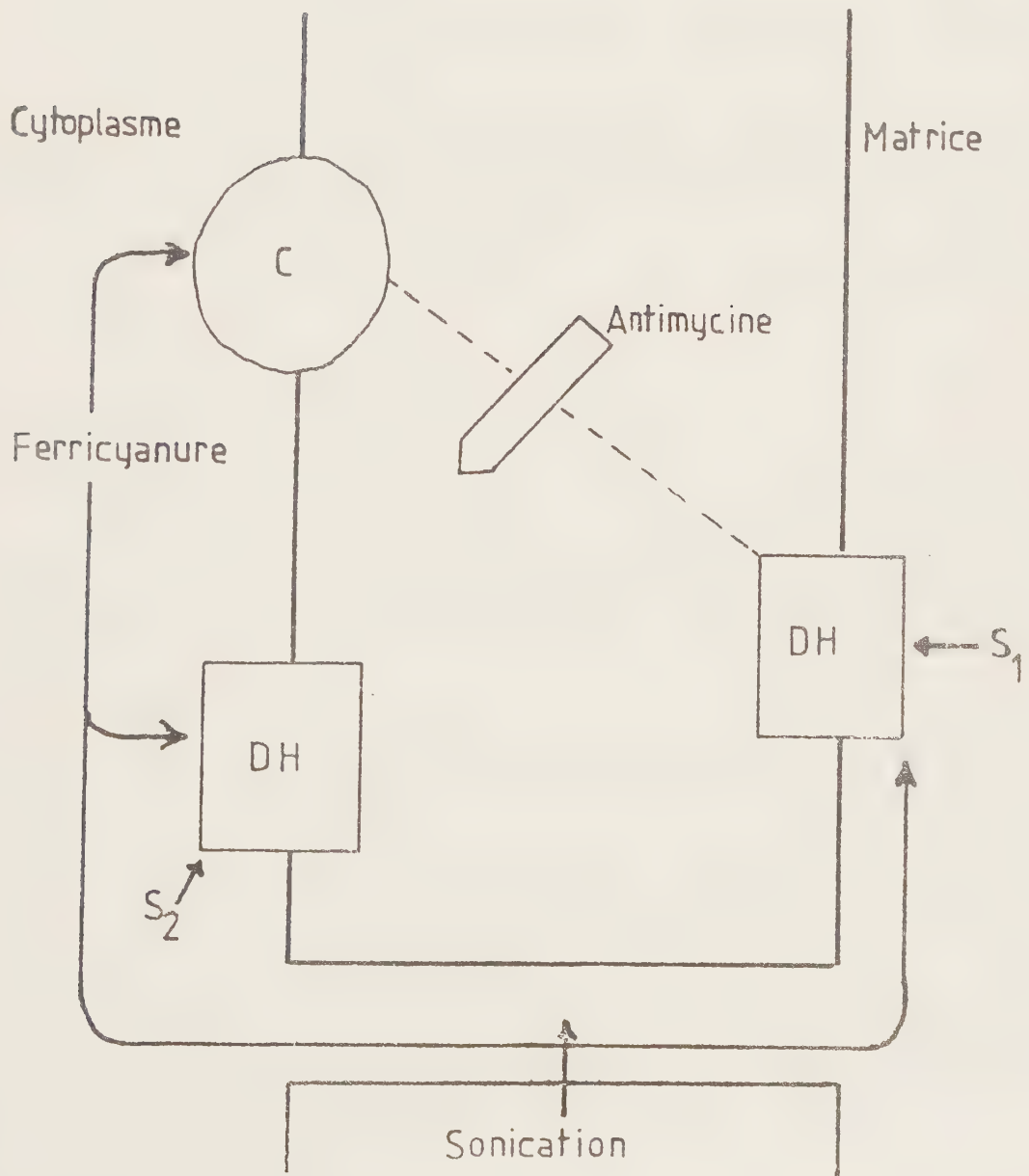
Les membranes externes isolées des mitochondries de foie de rat ne présentent pas de capacité liante avec ces anticorps. Il en est de même pour les membranes internes qui sont riches en cardiolipides, que ces membranes soient inversées ou orientées normalement. Il en résulte que les têtes polaires de la cardiolipine doivent être cachées à l'intérieur de la structure membranaire ou protégées par d'autres composantes. | 35 |

d) Méthodes d'accessibilité aux composantes de la membrane interne

- Méthode au ferricyanure | 36 | Figure : 1

FIGURE 1

PRINCIPE DE LA METHODE AU FERRICYANURE
d'après KLINGENBERG et VON JAGOW



Pour localiser certaines enzymes de la chaîne respiratoire, on utilise le ferricyanure dont la principale propriété est d'être un accepteur d'électrons. Dans les mitochondries intactes, le cytochrome C est le point principal d'attaque par le ferricyanure. Dans les particules soniquées, il réagit directement avec les déshydrogénases et sa réduction est insensible à l'antimycine.

Dans les mitochondries des mammifères, l'emploi du ferricyanure permet de localiser deux enzymes :

- * La succinate déshydrogénase sur la face interne.
- * La glycérophosphate déshydrogénase sur la face externe de la membrane interne.

Par contre, l'accepteur d'électrons ne présente aucune interaction avec les cytochromes ni à l'état mitochondrial natif, ni à l'état mitochondrial soniqué. Il n'est donc pas possible de savoir la disposition des cytochromes c_1 , b et aa_3 .

Les résultats de cette étude sont résumés dans la figure 2 :

- Fixation de marqueurs non pénétrants | 37 | :

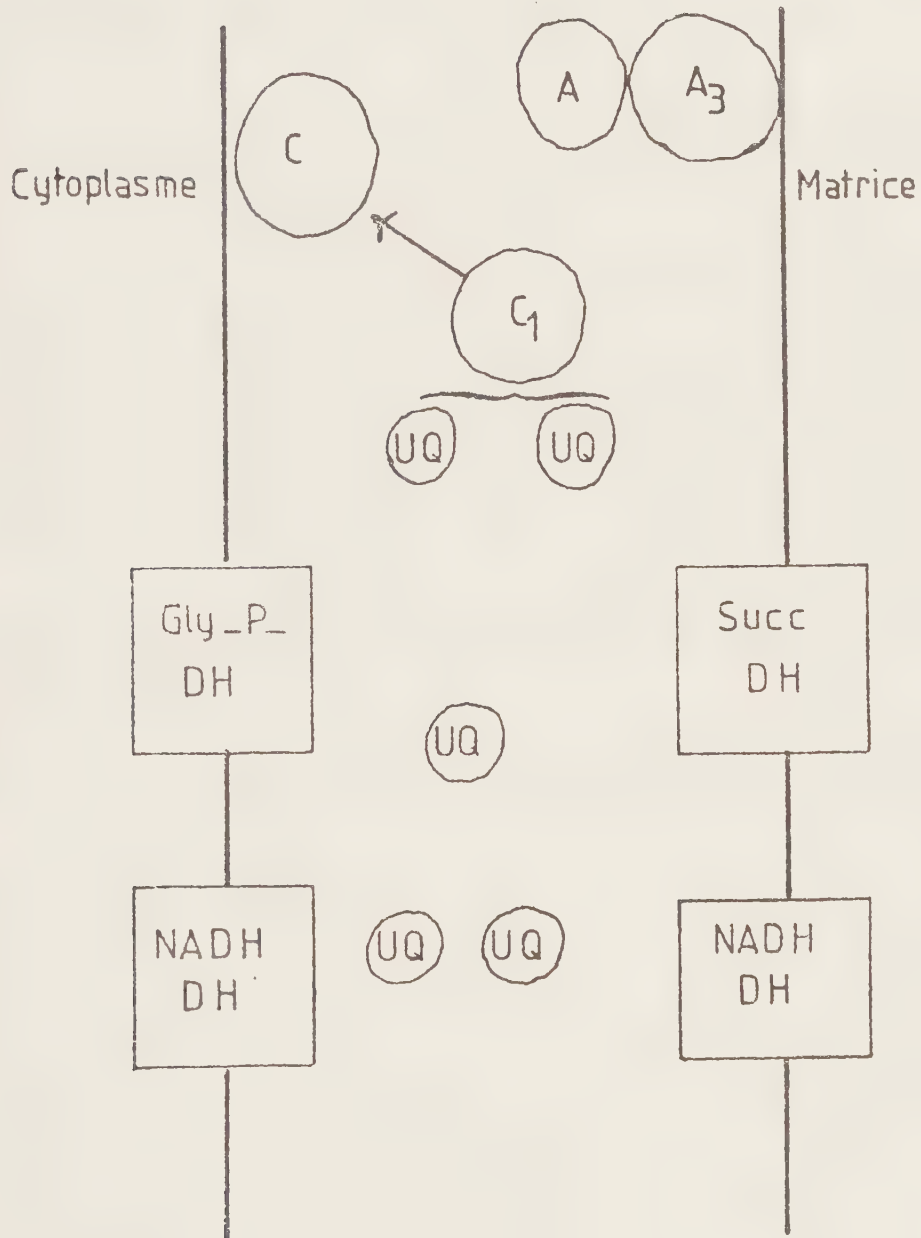
Marquage par le diazobenzène sulfonate : (^{35}S) - DABS)

Le DABS a pour propriété d'inactiver les enzymes situées sur l'une des deux faces de la membrane mitochondriale. La propriété de ce marqueur permet de situer les composantes protéiques de surface. C'est ainsi qu'il a été possible de localiser :

- * ATPase et succinate déshydrogénase (SDH) sur la face interne des mitoplastes isolés de foie de rat ;
- * NADH déshydrogénase dont :
 - un fragment est disposé sur la face interne
 - l'autre fragment sur la face externe.
- * La cytochrome-oxydase reste insensible au DABS qui marque d'une façon limitée les deux surfaces de la membrane.

FIGURE 2

L'ARRANGEMENT DES TRANSPORTEURS D'ÉLECTRONS
ET DES DESHYDROGENASES SUR LA MEMBRANE
INTERNE d'après KLINGENBERG et VON JAGOW



e)- Cryoclivage ou cryodécapage (Freeze-etching ou Freeze-fracture) et microscopie électronique

L. PACKER | 39 | L. PACKER et al | 38 |, R.L. MELNICK et
associent deux techniques le cryoclivage et la
microscopie électronique pour étudier la structure de la membrane
mitochondriale interne.

Après obtention des particules submitochondriales
de coeur de boeuf, celles-ci subissent l'action de l'hydrolyse par
la phospholipase A du venin de serpent. Elles sont ensuite soumi-
ses au cryodécapage puis observées au microscope électronique.

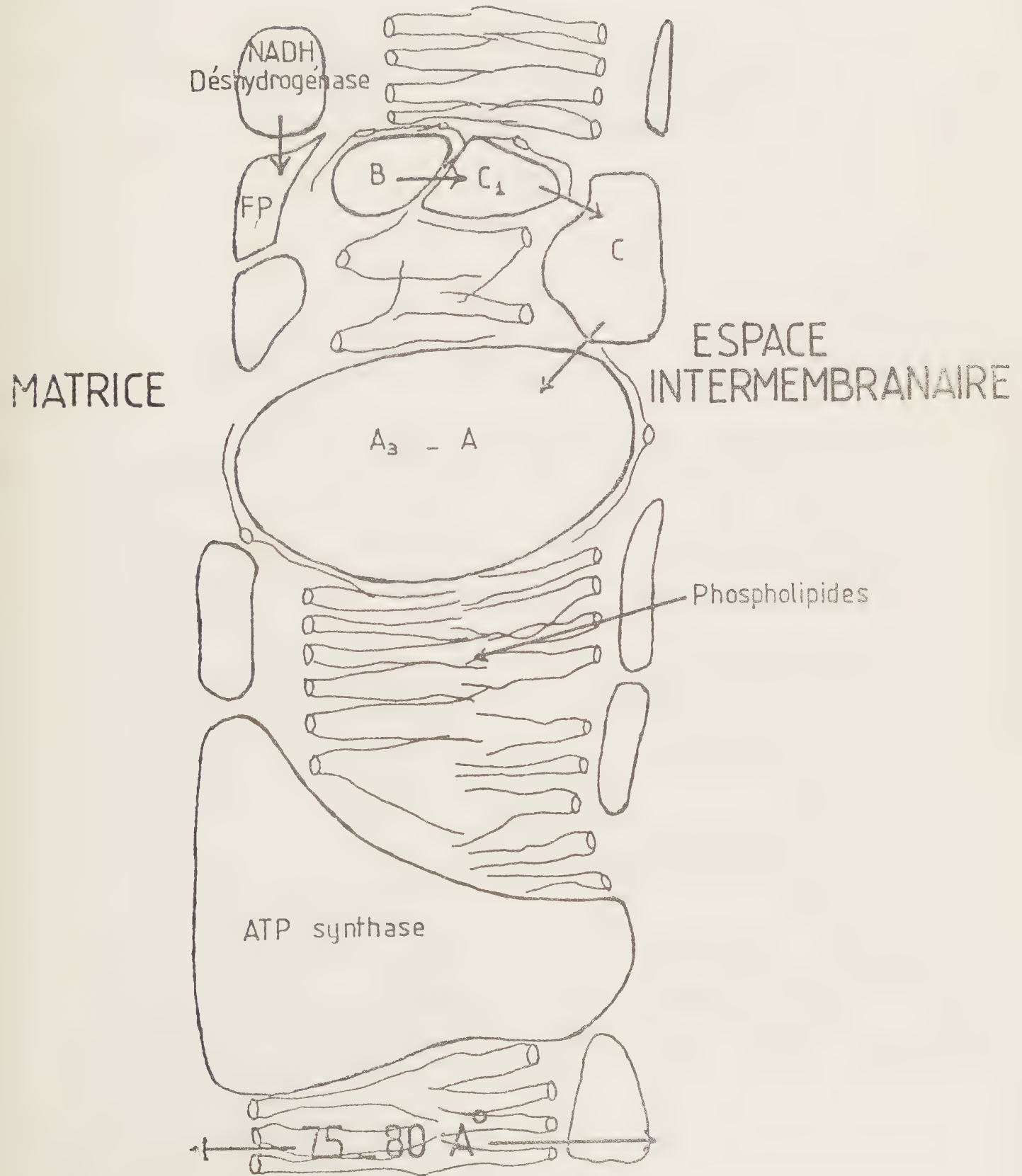
Les surfaces des mitochondries intactes du coeur
de boeuf montrent un aspect différent de celui des mitochondries
hydrolysées par la phospholipase A. Si la digestion est de 60 %,
apparaissent des composantes protéiques ou lipoprotéiques. Après
une hydrolyse totale, seule la charpente membranaire reste visible
dans les mitochondries, il en est de même de la structure des vé-
sicules submitochondriales qui se trouve réduite à une unique
membrane. La stabilité de la membrane est maintenue grâce à des
ponts protéiques enjambant toute l'épaisseur de la membrane.

Ces auteurs ont également montré que les phos-
pholipides contribuent à la plasticité de la membrane et que les
interactions sont soit de nature lipide-lipide, soit de nature
lipide-protéine.

Ces observations ont conduit L. PACKER | 40 | à propo-
ser un modèle structural de la membrane interne. Figure 3

FIGURE 3

ORGANISATION DE LA MEMBRANE INTERNE selon L. PACKER



TROISIEME CHAPITRE

ORGANISATION SPATIALE DU COMPLEXE O.S.ATPase

DANS LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE INTERNE

I - OBTENTION D'ATPases SENSIBLES A L'OLIGOMYCINE (O.S.ATPase)

Plusieurs méthodes ont été appliquées pour purifier le complexe ATPasique à partir de mitochondries d'origine diverse.

L'action de certains détergents (cholate ou désoxycholate | 41, 42 |, triton x-100 | 43 | sur des particules submitochondriales solubilise les O.S.ATPases. Cette solubilisation est suivie d'un fractionnement par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Les O.S.ATPases obtenues conservent les mêmes propriétés que l'enzyme liée à la membrane et notamment la sensibilité à l'oligomycine. Elles contiennent toutes une part plus ou moins importante de phospholipides (10 à 30 % en poids).

Une purification rigoureuse des O.S.ATPases mitochondriales n'est pas encore atteinte :

- * soit que les activités sont faibles
- * soit que les **préparations** contiennent des impuretés. | 44, 45, 46 |

II - LES COMPOSANTES FONCTIONNELLES DE L'O.S.ATPase

- ATPase insensible à l'oligomycine (F_1) :

Racker est le premier à avoir obtenu l'ATPase- F_1 très purifiée. A l'état pur, F_1 a perdu sa sensibilité à l'oligo-

mycine, inhibiteur caractéristique de la phosphorylation oxydative. Mais F_1 retrouve cette sensibilité après interaction avec une protéine membranaire qui est, elle, dépourvue de toute activité ATPasique, avec l'O.S.C.P. et avec les phospholipides.

Les F_1 sont isolées des mitochondries de coeur de boeuf, | 47, 48 | et récemment des mitochondries de coeur de porc | 49 |. Elles sont dépourvues de lipides. Leur poids moléculaire s'échelonne entre 325.000 et 385.000 | 50 | et leur diamètre varie de 90 à 100 Å°. Les propriétés catalytiques et physiques ont fait l'objet de nombreuses études résumées dans plusieurs revues récentes. | 51, 52 |

- Inhibiteur naturel de F_1 :

On l'appelle encore la protéine de PULLMAN et MONROY | 53 | (1963). Sa principale propriété consiste à masquer une grande partie de l'activité ATPasique qui augmente, comme l'ont montré HORSTMAN et RACKER | 54 |, lorsque les particules submitochondriales subissent un passage sur colonne de sephadex G-50 | 54 |.

La protéine de PULLMAN et MONROY de faible poids moléculaire | 53 | (15.000 quand elle est isolée de coeur de boeuf) inactive en présence d'ATP-Mg++ aussi bien F_1 purifiée que l'O.S. ATPase mais n'abolit pas les activités des ATPases non mitochondriales (microsomes, myosine).

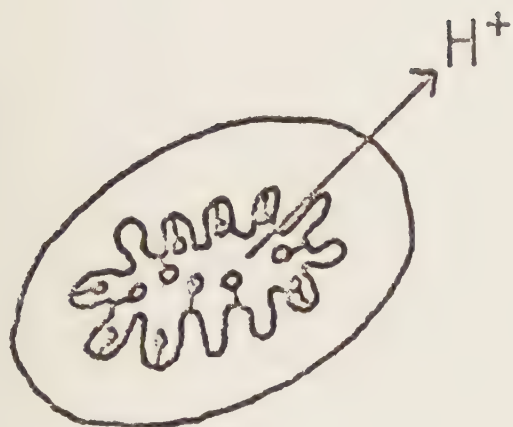
Cet inhibiteur protéique peut aussi être décroché de F_1 par hydrolyse protéolytique en présence de trypsine ou de chymotrypsine | 55 |.

Cette hydrolyse provoque une augmentation de l'activité ATPasique des particules submitochondriales de coeur de boeuf préparées par sonication ou de F_1 , si cette enzyme a été purifiée par un procédé qui n'inclut pas une élimination préalable de l'inhibiteur.

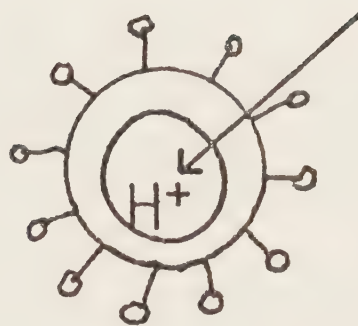
- Facteur membranaire

Les polypeptides qui font partie de la composition protéique de l'O.S.ATPase sont au moins au nombre de quatre. Leurs poids moléculaires sont de l'ordre de 55.000 - 29.000 - 20.000 et 10.000. Le polypeptide de poids moléculaire 29.000 a été isolé à l'état pur et constitue 10 % des protéines de la membrane interne. Le polypeptide de poids moléculaire 10.000 | 56 | est identifié comme étant le site d'action de l'inhibiteur : dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) | 57 |.

FIGURE 4



Mitochondrie entière



particule submitochondriale

F_1 et succino-déshydrogénase à la surface interne de la membrane interne ainsi que les autres déshydrogénases

Cytochrome c et c_1 à l'extérieur de la membrane interne

L'anti-cytochrome c est efficace
L'anti- F_1 est inefficace

- F_1 et les déshydrogénases sont à l'extérieur de la membrane interne

- Cytochromes c et c_1 sont sur la surface interne de la membrane

- L'anti- F_1 est efficace
L'anti-cytochrome c est inefficace.

ORIENTATION DE L'ATPASE- F_1 ET LOCALISATION DU
CYTOCHROME C PAR LA MÉTHODE IMMUNOLOGIQUE

III - DISPOSITION SPATIALE ET MORPHOLOGIE DE L'O.S. ATPase

- Orientation de F_1

(Figure : 4)

Cette orientation a été mise à jour par des méthodes immunologiques. RACKER a employé l'anticorps anti- F_1 et l'anticorps anti-cytochrome C. Avec ces anticorps, il a d'abord prouvé que les deux faces de la membrane interne sont asymétriques, que F_1 est orientée du côté matriciel (58,59) et que la position du cytochrome C est externe.

- Interaction de F_1 avec son inhibiteur spécifique

Parmi les méthodes qui ont servi pour déterminer la position de la protéine de PULLMAN et MONROY sur F_1 , il y a l'action ménagée de la chaleur (60), l'hydrolyse par la trypsine (55) et l'élution sur colonne de Sephadex G-25 (54). Ces méthodes dissocient la protéine inhibitrice de F_1 et montrent l'accessibilité de cet inhibiteur sur la face matricielle de la membrane interne.

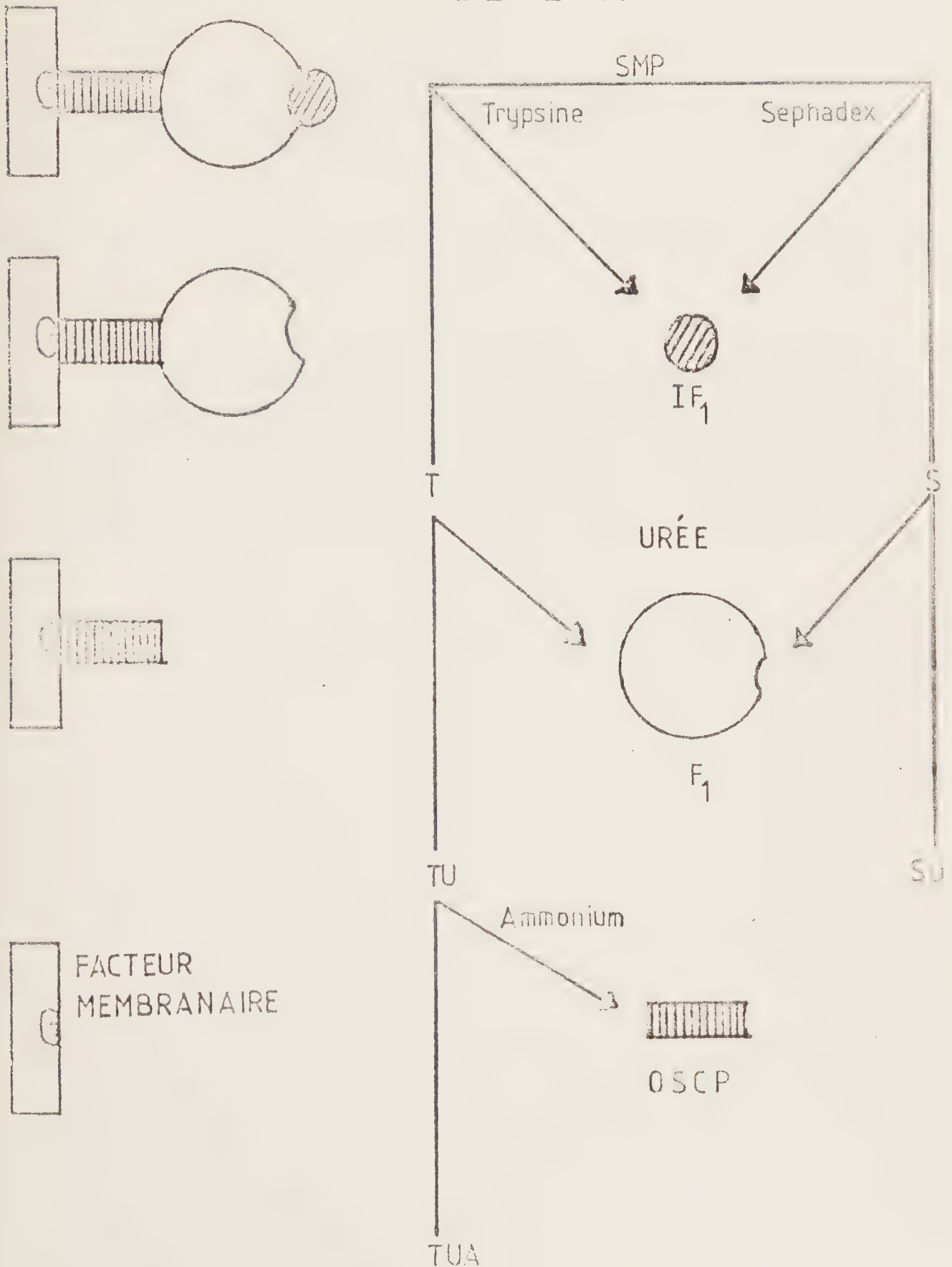
- Localisation de l'O.S.C.P.

L'O.S.C.P. est une sorte de pédoncule qui assure la liaison entre F_1 et le facteur membranaire. Ce rôle a été démontré par les actions successives de la trypsine, de l'urée et de l'ammonium qui séparent dans l'ordre respectif l'inhibiteur protéique, F_1 et enfin O.S.C.P. (Figure : 5). Seul le décrochage de l'O.S.C.P. modifie le signal de résonance de NCCD fixé sur le facteur membranaire. Le facteur O.S.C.P. est en liaison directe avec le protéolipide sur lequel se fixe le NCCD puisque seul son détachement entraîne des modifications du site fixateur.

- Disposition des polypeptides du facteur membranaire

Le facteur membranaire est le siège des protéines dont les activités sont inhibées par différents inhibiteurs (61) comme l'oligomycine et le DCCD qui agissent sur les mêmes sous-unités protéiques. L'ossamycine et la rutamycine sont d'autres inhibiteurs qui ont le même site d'action que l'oligomycine. L'aurovertine inhibe également les phosphorylations oxydatives, mais son siège se trouve sur ATPase- F_1 .

DECROCHAGES SEQUENTIELS DES COMPOSANTS DE L'O.S. ATPase



La microscopie électronique complète les études biochimiques. Elle constitue une autre méthode qui a révélé l'organisation spatiale de l'O.S.ATPase à partir des observations des coupes après fixation.

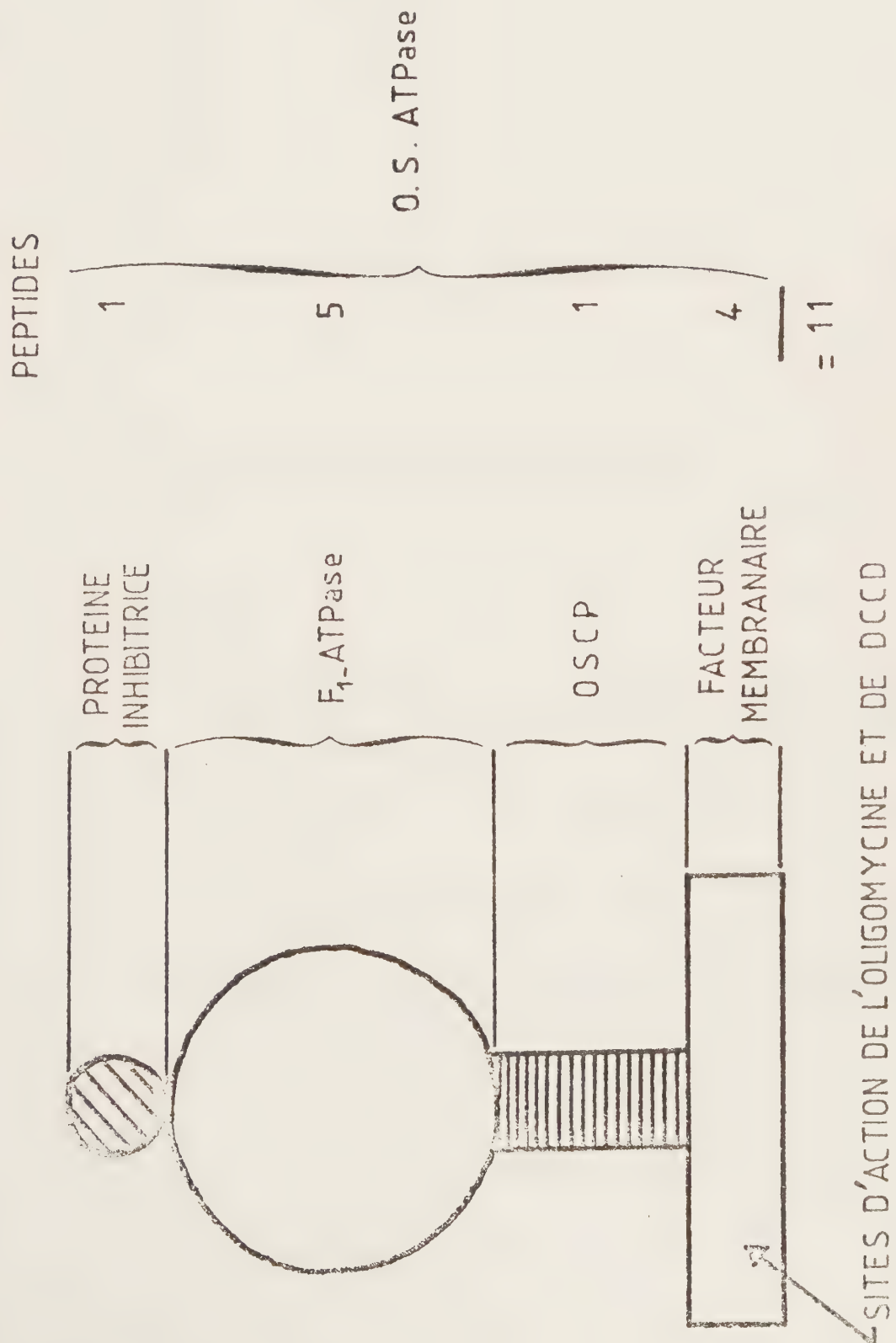
Pour conclure sur la topographie de l'O.S.ATPase, nous mentionnons le diagramme proposé par PETER, L. PEDERSEN | 52 | (1975). (Figure 6).

En résumé, la plupart des myopathies métaboliques des animaux domestiques semblent résulter d'une réaction unique de la cellule musculaire en deux étapes, perméabilité du sarcolemme puis dégénérescence, sous l'influence d'un trouble profond des processus aérobie respiratoires dont les mitochondries sont le siège. Donc, pour mieux comprendre les phénomènes pathologiques liés aux dégénérescences musculaires d'origine nutritionnelle, il est indispensable de connaître, d'abord, la structure de la membrane mitochondriale et de l'enzyme responsable de la synthèse de l'A.T.P. : O.S. ATPase.

Nous allons donc nous intéresser à l'emplacement des enzymes de la chaîne respiratoire et à l'organisation de l'O.S. ATPase dans les mitochondries de coeurs de porcs cliniquement sains.

DIAGRAMME DE L'O.S. ATPase (P.L. PEDERSEN 1975)

FIGURE 6



DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

Nous envisagerons successivement :

- les préparations et les isolements des membranes mitochondriales à partir de coeurs de porcs cliniquement normaux
- les méthodes de solubilisation et de purification de l'ATPase
- l'extraction du complexe O.S.ATPase des mitochondries de coeur de porc.
- l'hydrolyse par la trypsine en solution, les dosages des protéines et la technique des électrophorèses sur gel de polyacrylamide.

PREMIER CHAPITRE

PREPARATIONS ET ISOLEMENTS DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES

A PARTIR DES COEURS DE PORC CLINIQUEMENT NORMAUX

I - FRACTIONNEMENT CELLULAIRE ET ISOLEMENT DES MITOCHONDRIES DE COEUR DE PORC.

Selon la méthode de Crane (62) modifiée au laboratoire de Biochimie dynamique du Professeur GAUTHERON.

Les coeurs sont prélevés immédiatement après l'abattage de l'animal par électrocution et transportés dans de la glace au laboratoire (63). Toutes les opérations se déroulent en chambre froide (0° à 4° C).

1 - Broyage et homogénéisation.

Après élimination des tissus annexes, le muscle est découpé en petits morceaux, hâchés ensuite dans un broyeur de type "Moulinex". La pulpe est recueillie dans une solution de saccharose 0,25 M - phosphate de K 10 mM - pH 7,4 à raison de 300 ml de solution/100 g de muscle. Le broyat est agité constamment et le pH est réajusté à 7,6 avec KOH 6 N. Le mélange est ensuite homogénéisé pendant 35 secondes à vitesse maximale dans un "Turmix" pour faire éclater les cellules et libérer le maximum de mitochondries intactes. Le pH est à nouveau réajusté à 7,6 par addition de KOH 6 N.

2 - Centrifugations

Les centrifugations différentielles permettent la séparation des particules intracellulaires selon leur volume et leur masse.

Première centrifugation : 13 minutes à 1 600 g dans une centrifugeuse Jouan à 4° C.

Cette première centrifugation a pour but d'éliminer les particules les plus lourdes (noyaux) ainsi que les débris cellulaires et les quelques cellules qui ont échappé à l'homogénéisation.

Deuxième centrifugation : 20 minutes à 15 000 g dans une centrifugeuse MSE high Speed 18 à 4° C.

Cette deuxième centrifugation a pour but de sédimenter les mitochondries et de laisser en suspension les particules plus petites (microsomes, réticulum sarcoplasmique etc...)

Troisième centrifugation : 20 minutes à 15 000 g dans une centrifugeuse MSE high speed 18 à 4° C.

Cette centrifugation a pour but de laver les mitochondries.

II- MESURE DE L'INDICE DE CONTROLE RESPIRATOIRE (RCR) DES MITOCHONDRIES ISOLEES.

1 - Principe

Nous contrôlons l'aptitude des mitochondries à phosphoryler l'ADP en ATP en utilisant l'énergie libérée lors de l'oxydation d'un substrat par l'oxygène moléculaire le long de la chaîne respiratoire. L'oxygraphe sert à mesurer la vitesse de consommation d'oxygène par les mitochondries. Cet appareil est étalonné de façon à déterminer :

$$Q O_2 = \mu \text{atomes d'oxygène consommés par mg de protéines et par heure.}$$

Cette méthode permet également de vérifier le contrôle exercé par le taux d'ADP disponible sur la vitesse de fonctionnement de la chaîne. Lorsqu'un système est bien couplé, l'addition d'ADP déclenche la synthèse d'ATP | 64 | et stimule la respiration. Le rapport RCR peut être ainsi défini :

$$\text{RCR} = \frac{\text{taux respiratoire après addition d'ADP (état 3)}}{\text{taux respiratoire avant addition d'ADP (état 4)}}$$

RCR = Respiratory control Ratio

Les mitochondries de coeur bien couplées ont un $\text{RCE} > 5$ dans nos conditions expérimentales.

L'addition d'une quantité connue d'ADP provoque la consommation d'une quantité proportionnelle d'oxygène ; ce qui permet de calculer le rapport

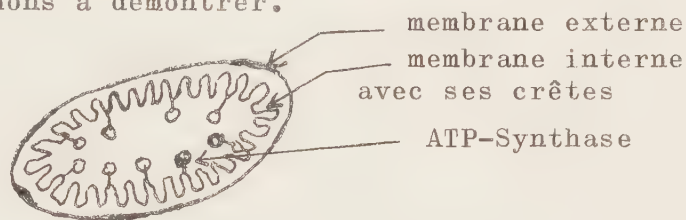
$$\frac{\text{ADP}}{0} = \frac{\text{moles d'ADP ajoutées}}{\text{atomes d'oxygène consommés pendant l'état 3}}$$

2 - Mode opératoire :

Après addition du milieu réactionnel et après stabilisation de la ligne de base, nous ajoutons les substrats glutamate 10 mM ou succinate 10 mM puis nous introduisons 1,5 à 3 mg de protéines mitochondriales. Une première consommation d'oxygène (état 4), correspondant à l'état de repos des mitochondries est enregistrée. L'addition d'ADP 0,2 mM stimule la consommation d'oxygène (état 3) qui est également enregistrée, et provoque la synthèse d'ATP. Lorsque tout l'ADP est transformé, la vitesse d'oxydation revient à l'état initial (état 4).

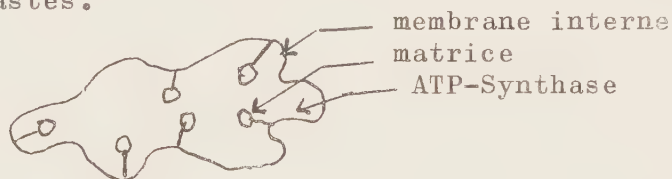
Pour étudier l'orientation des membranes mitochondriales de coeur de porc cliniquement sain, nous avons isolé les mitoplastes et obtenu à l'état pur les membranes internes. Pour réaliser ces préparations membranaires, nous avons appliqué la technique mise au point par Maïsterrena et al [65].

Schématisons tout d'abord ce que nous avons fait et ce que nous cherchons à démontrer.



Voici une mitochondrie entourée de la membrane externe et de la membrane interne avec ses replis porteurs de l'ATP-synthase.

Nous allons la dépouiller de sa membrane externe pour obtenir des mitoplastes.



Mitoplastes (MP) = membranes internes + matrices

Nous cassons les MP pour laisser s'échapper le liquide matriciel et préparer des membranes internes

membrane interne
ATP-Synthase



Les membranes internes ont la possibilité de se revésiculer en conservant leur polarité d'origine ou en s'inversant complètement.

III - TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT DES MITOCHONDRIES DE COEUR DE PORC CLINIQUEMENT NORMAL.

Isolement et purification des membranes externes, des mitoplastes et des membranes internes.

Le but de cette étude est d'isoler les membranes externes et de séparer les membranes internes à partir des mitoplastes. Cet isolement est effectué selon la technique mise au point par B. MAISTERRENA et al. | 65 | et dérivée de la méthode de PARSONS | 66 |

Les mitochondries (400-500 mg de protéines) sont mises en suspension dans une solution hypotonique de phosphate 10 mM. - pH 7,4 de façon à obtenir une suspension finale de 1 mg de protéines par ml. On laisse le gonflement se produire pendant 20 minutes à 0° C.

1 - Isolement des mitoplastes (MP)

La première centrifugation est effectuée à 105 000 g pendant 60 minutes dans une centrifugeuse Spinco L 50 (Rotor 30 - 29 500 rpm). Les surnageants S_I riches en enzymes marqueurs de l'espace intermembranaire sont écartés. Les culots C_I contenant membranes externes, membranes internes plus matrice sont remis en suspension dans du saccharose 0,25 M - Tris 10 mM - pH 7,4 puis centrifugés à basse vitesse à 11 500 g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse MSE High Speed 18, 10 000 rpm. Seuls les mitoplastes = (MP) membranes internes plus matrice sédimentent (C_{II}) alors que les membranes externes restent dans les surnageants S_{II}

2 - Isolement et purification des membranes externes.

Les surnageants S_{II} sont centrifugés à 105 000 g pendant 60 minutes (centrifugeuse Spinco L 50 - Rotor 30 - 29 500 rpm). Les nouveaux surnageants S_{III} sont éliminés alors que les culots III , riches en membranes externes sont remis en suspension dans 5 ml de saccharose 0,25 M - Tris HCl 10 mM - pH 7,4 et déposés sur un gradient de saccharose à trois couches : 25,2 % - 37,7 % - 51,7 % (w/v) puis centrifugés à 165 000 g pendant 45 minutes sur la centrifugeuse L 265 (rotor SW 41 Ti -

38 000 rpm). Les fractions obtenues (bandes 1,2 et 3) sont séparément prélevées pour les dosages des protéines et de la mono-amino-oxydase.

3 - Isolement et purification des membranes internes

Les culots C_{II} sont remis en suspension dans du saccharose 25,2 %, Tris HCl 10 mM pH 7,4 puis déposés sur un gradient à trois couches de saccharose (37,7 % - 51,7 % - 61,5 % (w/v) et centrifugés à 77 000 g pendant 90 minutes (centrifugeuse spinco L 50 - rotor 30 - 23 500 rpm). La bande protéique n° 6 située entre les couches de saccharose 37,7 % et 51,7 % est prélevée puis diluée huit fois dans de l'eau distillée pour faire éclater les mitoplastes et éliminer les enzymes matricielles. Cette bande est ensuite centrifugée à 35 000 g pendant 30 minutes (centrifugeuse spinco L50 - rotor 30 - 17 000 rpm).

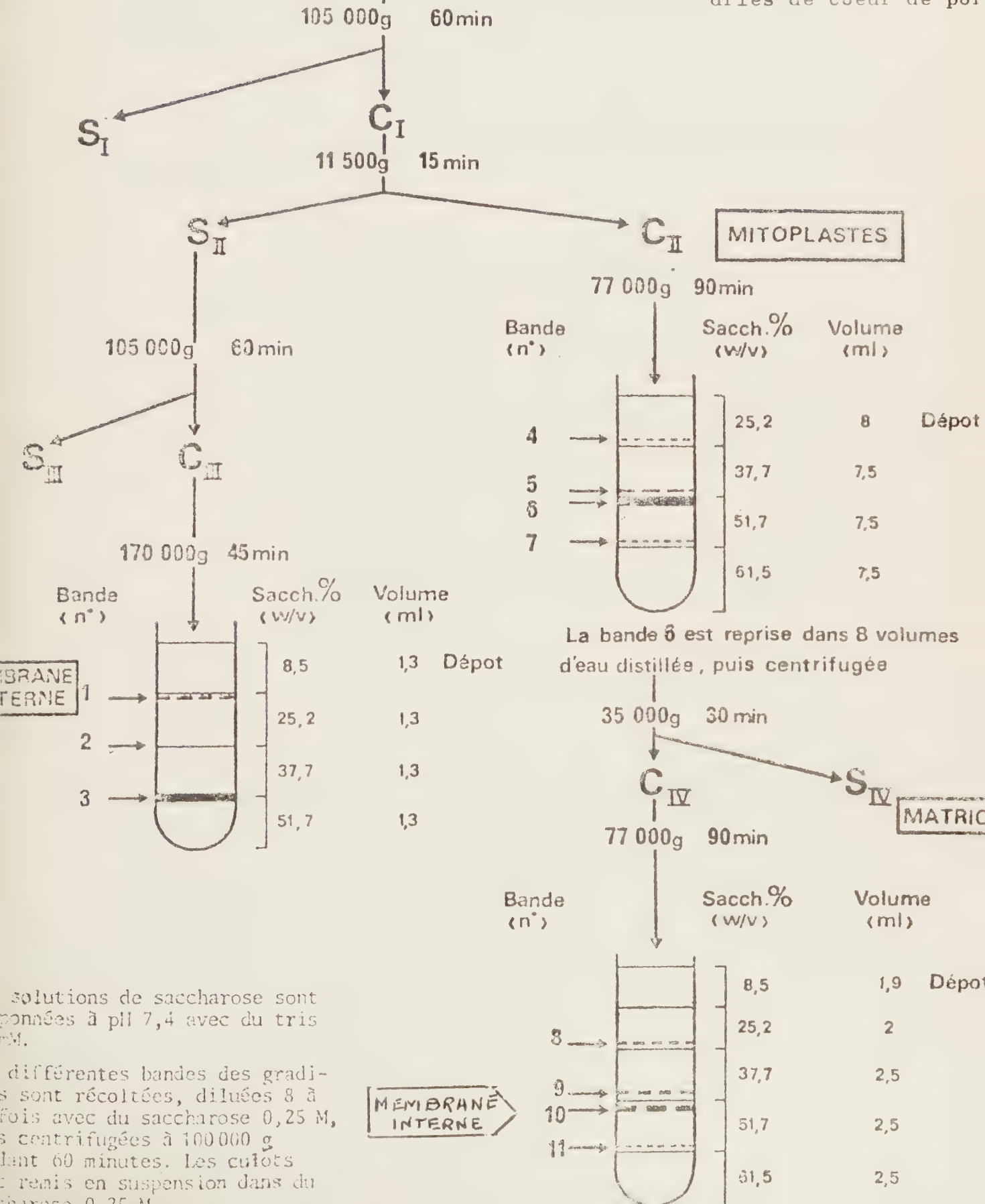
Le surnageant S_{IV} riche en enzymes matricielles est écarté. Le culot C_{IV} enrichi en membranes internes est remis en suspension dans du saccharose 0,25 M - Tris 10 mM pH 7,4 et déposé sur un gradient de saccharose similaire. Le deuxième passage sur gradient (centrifugeuse spinco L 50 - rotor 41 Ti - 21 000 rpm) permet la séparation de 4 fractions protéiques. Les fractions sont collectées et remises en suspension dans du saccharose 0,25 M - Tris 10 mM - pH 7,4 (Figure 7).

MITOCHONDRIES lavées deux fois

FIGURE 7

Gonflement en tampon phosphate (K) 10mM
pendant 20 mn (1mg/ml) 0 ° C

Mise au point d'un
schéma de fraction-
nement des mitochon-
dries de coeur de por



- La Figure (7) résume les différentes étapes d'extraction des mitoplastes, des membranes internes et des membranes externes.

Après le gonflement dans du tampon phosphate (K) 10 mM pendant 20 minutes, les mitochondries vont subir différentes centrifugations.

- * La première centrifugation élimine le liquide surnageant de l'espace intermembranaire.
- * La deuxième centrifugation permet de séparer les mitoplastes et les membranes externes S_{II}
- * Les mitoplastes sont déposés sur un gradient linéaire de Saccharose. La bande n° 6 qui contient les membranes internes est diluée dans 8 fois son volume d' H_2O puis centrifugée pour libérer la matrice
- * Le C_{IV} est ensuite déposé sur un deuxième gradient linéaire de saccharose puis recentrifugé. La bande 10 représente la bande enrichie en membranes internes
- * De l'autre côté, le même protocole est adapté pour extraire les membranes externes.

- Nous avons ensuite contrôlé la pureté et l'intégrité de nos préparations membranaires en dosant les enzymes marqueurs par différentes techniques.

IV - TECHNIQUES DE DOSAGES DES ENZYMES MARQUEURS

Nous avons suivi les activités de six enzymes marqueurs au cours du fractionnement mitochondrial

- * la mono-amine oxydase
- * la malate déshydrogénase
- * la NADH-oxydase
- * la cytochrome-oxydase
- * la succinate cytochrome c-réductase
- * l'ATPase

1 - Dosage de la mono-amine-oxydase (MAO) ; enzyme marqueur de la membrane externe.

MAO (EC 1.4.3.4.) est dosée selon la méthode spectrophotométrique de TABOR et ROSENTHAL (67) . Le substrat utilisé est la benzylamine :



$$\begin{array}{l} \text{Benzylamine} \\ \epsilon_{250 \text{ nm}} \end{array} = 139 \text{ L. Mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\begin{array}{l} \text{Benzaldéhyde} \\ \epsilon_{250 \text{ nm.}} \end{array} = 12\,771 \text{ L. Mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

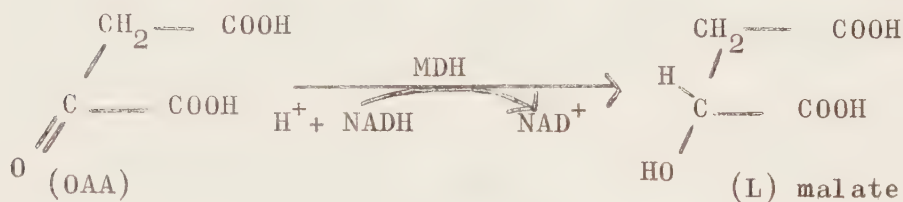
L'activité de la mono-amine-oxydase est mesurée par augmentation de la densité optique à 250 nm due à l'apparition de benzaldéhyde (spectrophotomètre Unicam).

Conditions de dosage : 1 ml de tampon phosphate 0,2 M pH 7,4 à 37° C plus protéines mitochondriales (0,4 à 2 mg), plus 100 μl de triton X-100 - 2 %.

Addition de 40 μl de benzylamine 0,1M uniquement dans la cuve réactionnelle. Dans la cuve témoin, le volume est complété par 40 μl de tampon phosphate 0,2 M - pH 7,4

2 - Dosage de la malate déshydrogénase (MDH) ; enzyme marqueur matricielle (68).

La malate déshydrogénase catalyse la réduction de l'oxaloacétate en (L) malate suivant la réaction :



La détermination de l'activité est basée sur la mesure spectrophotométrique de la disparition de la bande caractéristique du NADH à 340 nm en présence de l'enzyme et d'un excès d'oxaloacétate. Cette disparition du NADH est proportionnelle à la concentration en enzyme. Les mesures sont réalisées au spectrophotomètre UNICAM à 340 nm dans des cuves de quartz de 3 ml et de 1 cm de trajet optique.

Conditions de dosage : 2,5 ml tampon phosphate (Na) 0,1 M pH 7,4 à 30° C, plus 0,1 mg de protéines, plus 350 µl de triton X-100 - 0,1 %.

Additions de 5 µl Na₂ S 0,5 M, 2 µl roténone et 30 µl NADH 10 mM

La réaction est déclenchée par 20 µl d'oxaloacétate 5 mM dans la cuve réactionnelle. Le volume est complété par 20 µl de tampon phosphate 0,1 M dans la cuve témoin.

3 - Dosage des enzymes marqueurs de la membrane interne

a) NADH-oxydase

Le NADH sera oxydé le long de la chaîne respiratoire. Il en résulte une consommation d'oxygène qui sera mesurée par la méthode polarographique.

Conditions de dosage : Les protéines mitochondriales (0,1 à 0,4 mg) sont ajoutées dans un milieu contenant 1,8 ml de tampon phosphate 75 mM pH 7,4 à 30° C. La réaction est déclenchée par 100 μ l de NADH 20 mM.

40 μ l de cytochrome c 5 mM permettent de stimuler ou non l'oxydation de NADH par la chaîne respiratoire.

L'appareil de mesure est l'oxygraphe (modèle KM Gilson Medical) muni de l'électrode de Clark. La cellule de 1,8 ml est thermostatée à 30°C.

b) Cytochrome c oxydase

Le dosage utilise un substrat réduit qui sera oxydé par le cytochrome c. Celui-ci se réoxydera le long de la chaîne respiratoire par l'intermédiaire de la cytochrome c oxydase. Il en résulte une consommation d'oxygène mesurée par méthode polarographique. Le site II de la chaîne respiratoire est bloqué par un inhibiteur spécifique : l'antimycine.

L'appareil utilisé est l'oxygraphe (Modèle KM Gilson Medical) muni de l'électrode de Clark. La cellule de 1,8 ml est thermostatée à 30° C.

La méthode est celle de Sottocasa (69) utilisant l'ascorbate comme substrat réduit, pour déclencher la réaction.

Conditions de dosage : A 1,8 ml de tampon phosphate 75 mM - pH 7,4 - 30° C, on ajoute successivement 10 μ l d'antimycine A (0,5 mg/ml), 40 μ l d'ascorbate M, 40 μ l de cytochrome c 5 mM. On mesure la vitesse d'oxydation du cytochrome c témoin puis on ajoute 0,1 à 0,5 mg de protéines mitochondriales et on mesure la vitesse d'oxydation du cytochrome c

L'activité est calculée après déduction de la valeur témoin.

c) Succinate cytochrome c réductase

Principe :

Le succinate s'oxyde par un tronçon particulier de la chaîne respiratoire jusqu'au cytochrome c. On inhibe le reflux des électrons arrachés au substrat par addition de la roténone (site I) et on empêche la réoxydation du cytochrome c réduit par addition du cyanure de potassium (site III) qui bloque la cytochrome c oxydase. On suit la réduction du cytochrome c à 550,25 nm après avoir ajouté le succinate.

Mesures :

L'appareil utilisé est le spectrophotomètre Aminco Chance "à deux longueurs d'onde"

$$\epsilon_{550,25}^{\text{cytochrome c réduit}} = 27\,700 \text{ L. Mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{550,25}^{\text{cytochrome c oxydé}} = 9\,000 \text{ L. Mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

Conditions de dosage :

Additions successives de : 2,8 ml tampon phosphate 50 mM pH 7,4 incubé à 30° C

0,3 mg de protéines mitochondriales

2 μl de roténone (0,24 mg/ml d'alcool bidistillé).

20 μl de KCN 0,2 N

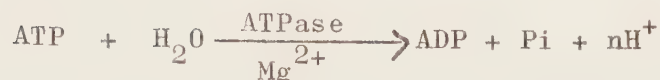
60 μl de cytochrome c oxydé 1 mM

La réaction est déclenchée par 60 μl de succinate 0,5 M.

Témoin :

En absence de protéines membranaires, on n'observe aucune réduction du cytochrome c.

d) Différentes méthodes de dosage de l'activité ATPasique



D'après cette réaction, il est possible de doser soit l'ATP, soit l'un des produits apparus ; le dosage de l'ATP est difficile, mais il est plus facile de doser l'un des trois produits formés.

d.1. Dosage du phosphate minéral

Principe :

Le phosphore contenu dans les milieux biologiques est dosé après transformation en orthophosphate minéral.

Application :

Le dosage comporte deux étapes : l'incubation de la solution enzymatique dans un certain milieu en présence de ses substrats et, une fois la réaction bloquée et les essais déprotéinisés, on procède au dosage proprement dit du phosphate minéral formé.

Méthode de Fiske et Subbarow (70)

Incubation des protéines mitochondriales et déprotéinisation

L'ATP est mis en présence de protéines mitochondriales et ceci pour des temps variables d'incubation à 30°C et dans un volume final de 4 ml.

Conditions de dosage : A 3,8 ml du milieu TKM (Tris HCL 0,1M - pH 7,5 - MgCl₂ 6mM - KCL 0,1 M) on ajoute 0,2 ml d'une suspension protéique (4 mg de protéines), en absence ou en présence d'oligomycine à raison de 1 µg par mg de protéines, et de 40 µl de 2,4- DNP 10⁻² M. La réaction est initiée à 30° C

par addition de 100 μ l d'ATP 0,1 M et stoppée par addition d'acide trichloracétique. Le phosphate libéré pendant l'incubation est dosé par la méthode de Fiske et Subbarow.

Témoin :

Au temps zéro des mesures, 0,5 ml de TCA 50 % sont ajoutés en même temps que la suspension protéique (4 mg). On obtient ainsi la quantité de phosphate minéral endogène.

Estimation du phosphate libéré :

Le phosphate est transformé en complexe phosphomolybdique puis ce dernier est réduit par un mélange d'acide 1 - amino- 2 naphтол-4 sulfonique de sulfite et bisulfite (réactif de Fiske et Subbarow). La lecture se fait au colorimètre à 700 nm.

d. 2. Dosage des protons libérés

Principe :

Le dosage est effectué par la méthode du "pH stat" (71) qui consiste à mesurer les quantités de base nécessaire pour maintenir le pH constant.

$$\text{Le rapport } n = \frac{\text{nombre de protons libérés}}{\text{nombre de moles d'ATP consommées}}$$

a une valeur très proche de 1 ; cette valeur permet d'évaluer la vitesse de fonctionnement de l'ATPase.

Mesures :

La réaction a lieu dans une cellule thermostatée. La soude 10^{-2} N est injectée en dessous de la surface du liquide par l'intermédiaire d'un tube capillaire.

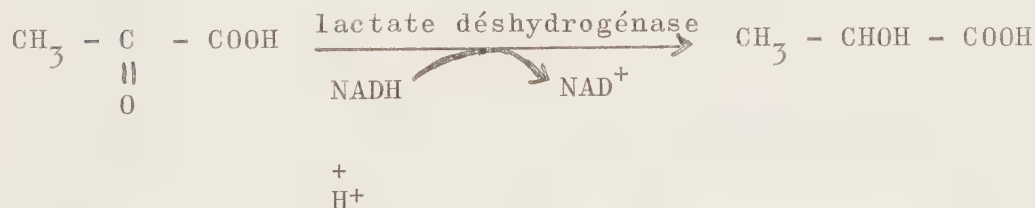
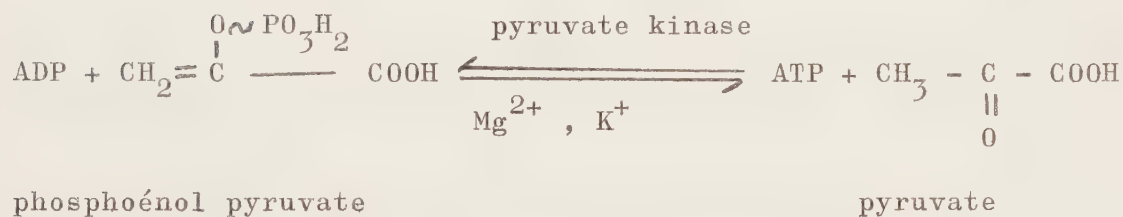
Pour étalonner la soude 10^{-2} N et pour tenir compte du pouvoir tampon des réactifs, on ajoute une quantité connue d'HCL 10^{-2} N et on enregistre le volume de soude nécessaire pour obtenir le retour au pH fixé.

Conditions de dosage : A 1,6 ml d'une solution 10 mM (d'acétate-Mg 20 mM et d'ATP 20 mM), on ajoute 2,4 ml d'eau distillée. Après équilibration thermique à 30°C, le pH réajusté à 9,0, la réaction est déclenchée par addition de 0,2 mg à 0,4 mg de la solution enzymatique.

d. 3. Dosage enzymatique de l'ADP par la méthode spectrophotométrique (72)



L'ADP formé est transformé suivant la réaction :



(lactate déshydrogénase ou NADH-pyruvique déshydrogénase)

La quantité de NADH qui disparaît 340 nm est proportionnelle à la quantité d'ADP formé.

$$\epsilon_{340 \text{ nm}}^{\text{NADH}} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ L. Mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Conditions de dosage : On met successivement dans la cuve 0,6 ml de milieu réactionnel (Tris-maléate 50 mM, MgSO_4 3 mM-pH 8,0, phosphoénolpyruvate 4 mM, NADH 0,4 mM, lactate déshydrogénase : 20 μg et pyruvate kinase : 30 μg), 20 μl d'ATP 0,1 M et 10 μl de Na_2S 0,5 M. La réaction, initiée par 10 μl de liquide surnageant se déroule en présence ou non de 5 μl d'oligomycine. La température d'incubation du milieu réactionnel est de 30° C.

L'évolution de l'absorption à 340 nm est enregistrée pendant quelques minutes après addition des protéines mitochondriales.

V - PREPARATION DES ETP "ELECTRON TRANSPORT PARTICLES " PAR SONICATION ET CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE (72)

Les suspensions de mitoplastes et de membranes internes en milieu de saccharose 0,25 M - Tris HCL 10 mM - pH 7,4 sont soniquées à 0° C pendant 30 secondes par lots de 5 ml à l'aide d'un sonicateur Branson

Les suspensions membranaires ainsi traitées sont centrifugées à 35 000 g pendant 10 minutes à 4° C (17 000 rpm - centrifugeuse High speed MSE) pour éliminer les particules non désintégrées. Les liquides surnageants sont recueillis et recentrifugés à 78 000 g pendant 90 minutes à 4° C (centrifugeuse Spinco L50) afin d'éliminer les phases solubles.

Quant aux suspensions mitoplastiques, elles subissent la première centrifugation à 13 500 rpm sur la même centrifugeuse et pendant le même temps. Les liquides surnageants recueillis sont soumis à une deuxième centrifugation à 39 000 rpm pendant 45 minutes sur la centrifugeuse Spinco L 50.

Les "ETP" préparées par ce traitement sont appelées membranes internes soniquées (MIS) et mitoplastes soniqués (MPS).

DEUXIEME CHAPITRE

METHODES DE SOLUBILISATION ET DE PURIFICATION DE L'ATPase

EXTRACTION DU COMPLEXE O.S. ATPase DES MITOCHONDRIES DE COEUR DE PORC A L'AIDE DE DETERGENTS.

A - METHODES DE SOLUBILISATION ET DE PURIFICATION DE L'ATPase.

I. Méthode de SENIOR et BROOKS | 73 |

- Préparation des ETP : par sonication et centrifugation différentielle.

Les ETP ainsi obtenues sont congelées à -20°C et peuvent être conservées sous cette forme pendant plusieurs mois.

- Solubilisation de l'ATPase : par sonication à pH alcalin et centrifugation différentielle.
- Précipitation par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: entre 37,5 et 52,5 % de saturation.
- Chromatographie sur colonne de DEAE
Sephadex A-50 (Pharmacia)

II. Méthode de Bruni et Bigon | 74 | adaptée aux mitoplastes et aux mitoplastes soniqués.

Cette méthode utilise la solubilisation sélective de l'ATPase par la cardiolipine (ou diphosphatidylglycérol), suivie d'une précipitation par le sulfate d'ammonium.

B - EXTRACTION DU COMPLEXE O.S. ATPase DES MITOCHONDRIES DE COEUR
DE PORC A L'AIDE DE DETERGENTS.

Nous avons décrit, dans notre thèse de spécialité, | 75 |, les expériences préliminaires qui nous ont guidés pour la mise au point d'un protocole expérimental permettant l'extraction et la purification partielle du complexe O.S. ATPase.

Les mitochondries (40 mg de protéines) sont lavées et traitées au Lubrol WX. Le culot obtenu après le traitement au Lubrol et centrifugation est d'abord traité avec le milieu A contenant du Triton X-100 - 0,05 % puisque cette concentration permet d'extraire très peu d'O.S. ATPase et presque 50 % de protéines | 75 |. Après centrifugation (Spinco, rotor 40, 40 000 rpm x 20 min), le culot obtenu est remis en suspension dans le milieu A contenant du Triton X-100 0,2 %. Après centrifugation (Spinco, rotor 40, 40 000 rpm x 20 min) le liquide surnageant Triton 0,2 % contient le complexe O.S. ATPase.

* Le milieu A = 20 ml de Saccharose 0,25 M-Tris
Hcl 10 mM - pH 7,4

TROISIEME CHAPITRE

HYDROLYSE PAR LA TRYPSINE EN SOLUTIONDOSAGES DES PROTEINESELECTROPHORESES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDEI - HYDROLYSE PAR LA TRYPSINE EN SOLUTION1) Principe d'hydrolyse par la trypsine

La spécificité de la trypsine est remarquable. Dans une protéine, la coupure se produit du côté du groupement carboxylique quand la chaîne latérale possède un caractère basique. Ainsi la trypsine est le seule enzyme [76] qui hydrolyse au niveau de l'arginine et de la lysine. Le nombre de fragments obtenus est de $(m + n + 1)$ après son action sur un polypeptide qui renferme m arginine (Arg) et n lysine (Lys).

Le pH légèrement alcalin (7,4) et l'incubation à 30°C sont deux conditions expérimentales qui permettent à la trypsine d'agir.

2) Etude préliminaire d'Hydrolyse par la trypsine (type Difco)

L'hydrolyse par ce type de trypsine est réalisée dans les conditions décrites par K. JUNTTI et al [34]. Les protéines mitochondriales (1 mg) sont incubées à 30° C en présence de 20 μ g de trypsine (saccharose 0,25 M - Tris Hcl 10 mM - pH 7,4). Au bout de dix minutes, on arrête l'action protéolytique par 100 μ g d'inhibiteur tryptique. Chaque fraction est conservée à zéro degré avant le dosage des activités enzymatiques.

On a ainsi préparé, par cette méthode :

Mitoplastes trypsées = MPT, Mitoplastes soniqués et trypsés = MPST, Membranes internes trypsées = MIT, membranes internes soniquées et trypsées = MIST

3) Protocole expérimental mis au point

Nous avons mis au point un protocole expérimental permettant d'étudier l'influence de l'hydrolyse par la trypsine sur les activités enzymatiques de différentes particules mitochondriales [75]

On incube dans un tube à essai 0,1 à 1 mg de protéines mitochondriales (mitoplastes soniqués ou mitoplastes normaux ou O.S. ATPase ou ATPase- F_1) dans 0,1 à 1 ml de saccharose 0,25 M

Tris-HCl 10 mM - pH 7,4 à 30° C. On ajoute au milieu d'incubation 1-2 μg de trypsine/ml et on suit l'hydrolyse des protéines en prélevant des aliquotes aux temps zéro, 5, 10, 15 minutes ... etc jusqu'à l'arrêt de la réaction. On détermine aussi l'activité ATPasique sur les prises d'essai de 10 μl et les variations de cette activité en présence ou en absence de 1 μl d'oligomycine (d'une solution de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'alcool bidistillé). Les contrôles qui accompagnent chaque fois les essais sont réalisés avec 5 fois plus d'inhibiteur que de trypsine dans un autre tube à essai incubé dans les mêmes conditions. On répète l'hydrolyse tout d'abord avec 10-20 μg puis avec 100-200 μg de trypsine par ml, c'est-à-dire par mg de protéines mitochondriales et on détermine l'activité ATPasique et ses modifications par l'oligomycine dans des conditions identiques aux précédentes.

L'activité ATPasique est dosée par la méthode spectrophotométrique.

II. DOSAGES DES PROTEINES

1) Méthode du Biuret rapide | 77 |

Cette méthode est utilisée pour doser des solutions relativement concentrées (à partir d'environ 5 mg/ml).

Une solution fortement alcaline de Cu SO_4 (Na OH 10 %) donne un complexe entre le cuivre et les liaisons peptidiques dont la coloration violette est mesurée à 540 nm au colorimètre Coleman. On fait un blanc réactif et une gamme étalon avec une solution standard d'ovalbumine à 5 mg/ml. Les protéines sont dosées sur 60 μl de suspension mitochondriale.

2) Méthode de Lowry et al. | 78 |

Cette méthode est beaucoup plus sensible que la précédente. Elle est utilisée pour doser les solutions moins concentrées en protéines, donc employée pour déterminer les protéines dans les fractions membranaires et les particules submitochondriales.

La coloration bleue développée par les protéines est due à la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par le complexe protéine-cuivre ; réduction faisant intervenir les groupements fonctionnels phénoliques de la tyrosine, du tryptophane et à un degré moindre la cystéine et l'histidine. Cette coloration

bleue est mesurée à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman modèle 25.

III. ELECTROPHORESES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Nous avons adopté la technique de Weber et Osborn
| 79 | modifiée par Catteral et Pedersen | 80 |

1) Principe

Les protéines sont dépolymérisées en présence d'urée concentrée et de dodécylsulfate de sodium (SDS). Le SDS leur confère à toutes la même charge négative à pH 7,1. Ainsi leur mobilité électrophorétique dans un gel de polyacrylamide ne dépend que de leur poids moléculaire.

Cette méthode a pour avantages :

- d'apprécier le degré de pureté d'une protéine en cours de purification
- d'évaluer les poids moléculaires des sous-unités protéiques par emploi de marqueurs protéiques
- de déterminer le nombre de chaîne polypeptidiques d'un oligomère pur.

2) Mode opératoire

a) Composition des gels de polyacrylamide

Acrylamide et bis-acrylamide ont été recristallisés avant l'emploi.

Tampon phosphate de sodium 0,1 M - pH 7,1

(SDS) = Dodécyl sulfate de sodium	0,1 %
Acrylamide	10 %
Bis-acrylamide	0,27 %

(le premier mélange est dégazé pendant 30 minutes)

TEMED (N-N'-N' - tétraméthylène diamine)	0,01 %
Persulfate d'ammonium	0,05 %

La solution d'acrylamide est introduite à la pipette dans des tubes en verre, longs de 12 cm d'un diamètre intérieur de 0,6 cm. Avant que les gels ne durcissent, quelques gouttes d'eau sont ajoutées à leur sommet afin d'obtenir une surface plane, l'apparition d'une interface indique la solidification des gels. La polymérisation s'effectue en 2 heures à température ambiante.

b) Tampon d'électrophorèse :

phosphate de sodium 0,1 M	} pH 7,1
SDS 0,1 %	

c) Préparation des échantillons:

Les protéines (de 9 μg à 100 μg) sont dépolymérisées dans un milieu : urée 10 M - SDS 1 % - β -mercaptoéthanol 1 % - phosphate de sodium 10 mM - pH 7,0 pendant 2 heures à 45° C.

Le volume déposé à la micropipette sur chaque gel est de 200 μl , la densité du dépôt est augmentée par addition de deux gouttes de glycérol. On ajoute 10 μl d'une solution de pyronine Y à 0,5 mg/ml dans l'éthanol ; ce marqueur de faible poids moléculaire permet de visualiser la migration.

d) Electrophorèse

Le tampon est introduit dans les deux compartiments de l'appareil. L'électrode négative est reliée au compartiment supérieur et l'électrode positive au compartiment inférieur. L'intensité du champ électrique appliqué est de 2 mA/gel pendant une heure, puis de 8 mA/gel pendant 8-12 heures.

Lorsque la migration est terminée, le front de migration est repéré et les gels sont extraits des tubes à l'aide d'une seringue, en injectant un peu d'eau pour les décoller.

e) Milieu de coloration

Les protéines sont ensuite fixées par une solution de TCA 50 % pendant 12 heures. Les gels sont alors colorés dans une solution de Bleu de Coomassie 0,31 g/100 ml d'éthanol : eau (1:1). Juste avant usage on ajoute 11,5 ml d'acide acétique glacial.

f) Milieu de décoloration des gels :

Afin d'éliminer la coloration des parties non protéiques du gel, il est procédé à une décoloration dans une solution

- acide acétique glacial	75 ml
éthanol	250 ml
méthanol	50 ml
eau distillée q.s.p.	1 000 ml

Le bain de décoloration est renouvelé plusieurs fois.

g) Analyse des gels :

Les gels sont densitométrés sur un lecteur de gels ISCO à 580 nm pour déterminer l'intensité de la coloration et le nombre de bandes protéiques présentes.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous envisagerons successivement :

- les orientations des particules submitochondriales isolées de coeurs de porcs cliniquement normaux
 - l'activité du complexe O.S. ATPase isolé des mitochondries de coeur de porc
- les gels d'électrophorèse des F_1 et des O.S. ATPases
- l'organisation de l'ATPase sensible à l'oligomycine isolée de coeurs de porcs cliniquement normaux.

PREMIER CHAPITRE

ORIENTATIONS DES PARTICULES SUBMITOCHONDRIALES ISOLEES

DE COEURS DE PORCS CLINIQUEMENT NORMAUX.

Il est nécessaire de contrôler l'intégrité et la pureté des membranes externes et internes avant d'appliquer les moyens qui sont la sonication et l'Hydrolyse par la trypsine pour déterminer l'orientation des particules submitochondriales internes. Le contrôle s'effectue par des mesures des activités enzymatiques que l'on suit le long du fractionnement mitochondrial.

I - CONTROLES DE PURETE ET D'INTEGRITE DE LA MEMBRANE EXTERNE

* La mono-amine oxydase est l'enzyme réputée marqueur de la membrane externe.

Mitochondries coeur de porc	Activités spécifiques en moles Benzaldéhyde apparues/mn/mg
Mitochondries intactes	0,9
Bande supérieure (1)	3,2
Bande moyenne (2)	0,8
Bande inférieure (3)	0,8
Mitochondries foie de rat	9

TABLEAU I. Dosage de la mono-amine oxydase

TABEAU I. Activité comparée de la mono-amine oxydase dans les mitochondries entières et les gradients de purification de la membrane externe.

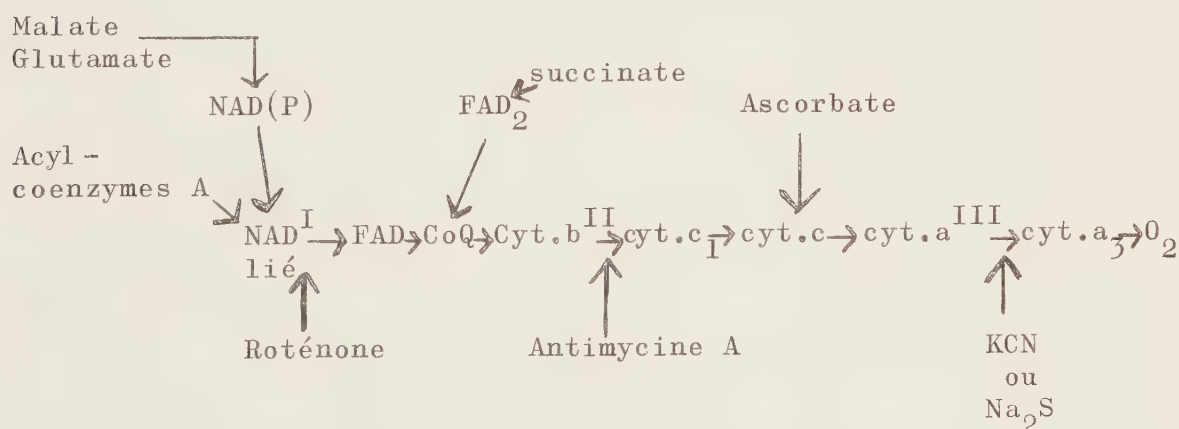
Son activité est mesurée par la méthode spectrophotométrique dans les mitochondries de coeur de porc et de foie de rat, et dans les bandes supérieure, moyenne et inférieure de la figure 7.

Comme l'indique le tableau (I), la mono-amine oxydase a une faible activité dans les mitochondries de coeur de porc et dans les bandes moyenne et inférieure. Cependant, elle est plus active dans la bande supérieure.

Il en résulte que c'est dans la bande supérieure que la membrane externe est localisée et que la mono-amine oxydase est également enzyme marqueur de cette membrane dans les mitochondries de coeur de porc.

II- CONTROLES PURETE ET D'INTEGRITE DE LA MEMBRANE INTERNE

Les méthodes de dosage que nous avons employées sont basées sur les propriétés de la chaîne respiratoire. Nous rappelons donc quelques données fondamentales sur la séquence des transporteurs de cette chaîne que l'on a l'habitude de représenter sous une forme linéaire.



Le glutamate, le succinate et l'ascorbate s'oxydent en libérant les électrons le long de la chaîne respiratoire.

Le transit des électrons peut être bloqué par des inhibiteurs au niveau de trois sites :

- au niveau du site I par la roténone
- au niveau du site II par l'antimycine
- au niveau du site III par KCN ou Na₂S

La cytochrome oxydase, la succinate-cytochrome c réductase et l'ATPase sont trois enzymes de la membrane interne dont les activités évoluent au cours du fractionnement.

Enfin nous dosons la malate déshydrogénase : enzyme matricielle.

1) Activité de la cytochrome oxydase

Cette activité est mesurée dans les mitochondries entières de coeur de porc et de foie de rat et dans les bandes supérieure, moyenne et inférieure de la figure 7.

Cytochrome oxydase		
Fractions		nmoles O ₂ consommées/mn/mg prot.
Mitochondries de coeur de porc	Mitochondries	1 975
	Bande 8 supérieure	765
	Bande 9 moyenne	2 005
	Bande inférieure	2 760
	10 (M.I.)	
Mitochondries de foie de rat		1 330

TABEAU II. Dosage de la cytochrome oxydase

Ce tableau (II) montre que l'activité de cette enzyme augmente pendant le fractionnement et que la bande inférieure est enrichie en cytochrome oxydase. Cette bande correspond à la fraction membranaire interne purifiée.

2) Activité de la succinate-cytochrome c réductase

Fractions	nmoles cyt.c réduit/mn/mg prot.
Mitochondries	89
Mitoplastes	118
Membranes internes	141

TABLEAU III Dosage de la succinate-cytochrome c réductase

On suit son activité dans le culot mitochondrial lavé deux fois, le culot II correspondant aux mitoplastes et dans le culot IV enrichi en membranes internes (voir figure 7.)

Son activité spécifique va en augmentant des mitochondries aux membranes internes purifiées.

3) Activité ATPasique

Fractions	Effecteurs	Activités en nmoles Pi/mn/ mg prot.	% d'activation 2,4-DNP	% d'inhibition /oligomycine
Mitochondries	0	54		
	2,4 - DNP	123	+ 130	
	2,4-DNP + oligomycine	14		- 89
Membranes	0	187		
	2,4 - DNP	280	+ 50	
	2,4-DNP + oligomycine	87		- 69

TABLEAU IV Activité ATPasique dosée par la méthode de Fiske
et Subbarow

Le commentaire du tableau (IV) fait appel en même temps à quelques remarques.

Racker | 58, 59 | a montré par des méthodes immunologiques que l'ATPase- F_1 est l'enzyme marqueur des membranes mitochondriales internes.

L'activité ATPasique, comme l'indique le tableau (IV) est plus importante dans les membranes internes purifiées que dans les mitochondries.

Mais conserve-t-elle ses propriétés dans les membranes obtenues à l'état pur ? L'action de deux effecteurs : le 2,4 DNP et l'oligomycine, permet de le confirmer.

Le 2,4 DNP stimule l'activité ATPasique dans les mitochondries, par contre cette stimulation n'est que de 50 % dans les membranes internes.

L'oligomycine est l'inhibiteur des phosphorylations oxydatives. Dans le tableau, on montre que cette inhibition en présence de 2,4 DNP est de 89 % dans les mitochondries ; et elle est de 69 % dans les membranes internes purifiées.

En conclusion, on peut dire que l'ATPase est encore munie de sa sensibilité aux effecteurs, une fois que les membranes internes sont obtenues à l'état pur.

4) Dosage de la malate déshydrogénase

Fractions		Activités spécifiques nmoles NADH oxydées mn/mg protéine
Culot initial	Mitochondries	10 700
CII	Mitoplastes	16 000
Bande 10, CIV	Membranes internes	6 700
Bande 1, CIII	Membranes externes	280

TABLEAU V : Dosage de la malate déshydrogénase

Le contrôle de pureté et d'intégrité de la membrane interne est également basé sur la mesure de l'activité de la malate déshydrogénase MDH.

Il convient donc de suivre l'activité de la malate déshydrogénase au cours de l'isolement membranaire, c'est-à-dire dans les mitochondries, dans les mitoplastes et dans les bandes 10 et 1. Celles-ci représentent respectivement la membrane interne purifiée et la membrane externe. (Figure 7).

- Le tableau (V) montre que l'activité de cette enzyme est importante dans les mitochondries, et qu'elle est plus élevée encore dans les mitoplastes. En revanche, l'activité est relativement faible au niveau des membranes internes et externes (bandes 10 et 1)

- La malate déshydrogénase peut être adsorbée de façon fonctionnelle sur les membranes internes ou bien elle peut être considérée comme une contamination qui se produit au cours de la purification membranaire.

III- MODIFICATIONS PAR LA SONICATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DES MITOPLASTES ET DES MEMBRANES INTERNES.

Quels sont les effets de la sonication sur les mitoplastes et les membranes internes isolées de coeur de porc cliniquement sain ? Tel est le but de ce paragraphe.

Pour rechercher les effets de la sonication sur les mitoplastes et les membranes internes isolées de coeur de porc cliniquement sain, les activités des enzymes marqueurs sont comparées dans les particules membranaires normales et inversées. Le tableau (VI) récapitule les activités des enzymes marqueurs dosées.

1) Activité ATPasique

Elle augmente dans les mitoplastes soniqués par rapport aux mitoplastes normaux, mais cette augmentation est insignifiante dans les membranes internes soniquées.

La sonication rend donc l'ATPase plus accessible dans les mitoplastes soniqués. Voir tableau VI

2) Activité de la succinate-cytochrome c réductase

La sonication entraîne une perte d'activité aussi bien dans les mitoplastes que dans les membranes. Cette baisse d'activité est de 58 % dans les mitoplastes soniqués ; elle est de 66 % dans les membranes internes soniquées.

3) Activité de la cytochrome oxydase

Le principe du dosage nécessite une addition du cytochrome c puisque l'on mesure la réoxydation du cytochrome c réduit. Il y a une perte d'activité après l'effet sonicateur dans les mitoplastes et les membranes internes soniquées.

4) Activité de la malate déshydrogénase

Le liquide matriciel s'échappe après l'action de la sonication. Il faut donc s'attendre à une diminution d'activité dans les particules mitoplastiques soniquées. Le tableau (IV) indique qu'elle est de 64 %.

Enzymes	Activités spécifiques		Effet sonication %	Activités spécifiques		Effet sonication %
	MP	MPS		MI	MIS	
Malate déshydrogénase (MDH)	16 700	5 800	- 64			
cytochrome oxydase	1 386	654	- 53	2 292	1 835	- 20
succinate-cytochrome c réductase	118	50	- 58	141	48	- 66
ATPase	248	420	+ 69,4	583	601	+ 2,2

TABLEAU VI Etudes comparées des activités enzymatiques avant et après sonication. Les dosages enzymatiques de la malate déshydrogénase, de la cytochrome oxydase et de la succinate-cytochrome c réductase ont été décrits dans la partie expérimentale.

MP = mitoplastes. MPS = mitoplastes soniqués

MIS = membranes internes soniquées.

MI = membranes internes

5) Activité de la NADH - oxydase

Fractions	n. atomes d'O ₂ consommés/mn/mg prot	Effet de la sonication en %	% de stimulation par le cytochrome c
MP	198		
MP + cyt. c	471		+ 139
MPS	882	+ 345	
MPS + cyt.c	882		0
MI	414		
MI + cyt.c	714		+ 73
MIS	369	- 11	
MIS + cyt.c	682		+ 85

TABLEAU VII - Effets du cytochrome c sur l'oxydation de NADH par des particules mitoplastiques (MP) et membranaires (MI) soniquées ou non.

Racker et son équipe (58) ont démontré que le site de fixation du cytochrome c se trouve sur la face externe de la membrane mitochondriale interne. Nous avons donc étudié l'effet de la sonication et de l'addition de cytochrome c sur la vitesse d'oxydation de NADH par la chaîne respiratoire.

L'activité de NADH-oxydase augmente considérablement dans les mitoplastes soniqués et diminue légèrement dans les membranes internes soniquées. Mais la stimulation par le cytochrome c est plus forte dans les mitoplastes normaux et est nulle dans les mitoplastes soniqués. La stimulation est la même dans les membranes internes soniquées ou normales.

L'absence d'effet du cytochrome c dans les mitoplastes soniqués signifie que les mitoplastes ont été inversés par sonication. Les mitoplastes ont donc une orientation normale lorsqu'ils sont préparés mais s'inversent après sonication.

Quant aux membranes internes, elles ne sont pas dans un état homogène.

IV - MODIFICATIONS PAR LA TRYPSINE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DES MITOPLASTES ET DES MEMBRANES INTERNES.

L'action de la trypsine a été appliquée aux membranes normales ou inversées pour déterminer la position naturelle qu'occupent certaines protéines enzymatiques choisies pour cette étude.

Nous avons suivi les activités des mêmes enzymes marqueurs

Les particules mitoplastiques (mitoplastes normaux et soniqués) et les particules membranaires (membranes normales et soniquées) sont hydrolysées par la trypsine selon les conditions de Juntti (34)

1) Activité de la NADH-oxydase :

Tableau VIII

L'oxydation est totalement inhibée dans les différentes fractions membranaires après l'action protéolytique par la trypsine. Mais l'oxydation reprend dans ces mêmes fractions hydrolysées après un apport du cytochrome c. Le tableau VIII

Fractions	natomes O ₂ consommés		% de stimulation par le cytochrome c
	sans cyt. c	+ cyt. c	
MP	198	471	+ 139
MPT	0	207	Activité restaurée
MPS	882	882	0
MPST	0	202	Activité restaurée
MI	414	714	+ 73
MIT	0	110	Activité restaurée
MIS	369	682	+ 85
MIST	0	110	Activité restaurée

TABLEAU VIII - Effets du cytochrome c sur l'oxydation de NADH par les particules mitoplastiques et membranaires avant et après leur hydrolyse par la trypsine (Difco)

- Après l'hydrolyse par la trypsine (Difco) selon la méthode de Juntti et al (34), l'oxydation de NADH par la chaîne respiratoire est dosée d'après les conditions décrites dans la partie expérimentale.

montre que la NADH oxydase ne semble pas être touchée par la trypsine dans les différents types de particules.

2) Activité ATPasique :

Tableaux IX et X

Elle est stimulée dans les mitoplastes (+ 64,5 %), dans les mitoplastes soniqués (+ 43,8 %) et les membranes internes soniquées (+ 33,8 %) après l'hydrolyse par la trypsine qui reste sans effet sur l'activité ATPasique des membranes internes (+ 2 %)

3) Activité de la cytochrome oxydase :

Tableaux IX et X

L'action protéolytique de la trypsine ne modifie pas l'activité de la cytochrome oxydase dans les particules mitoplastiques (MPT et MPST)

Par contre, la trypsination inhibe cette activité dans les fractions membranaires (MIT et MIST).

4) Activité de la succinate-cytochrome c réductase :

Tableaux IX et X

Cette activité augmente dans les mitoplastes après hydrolyse par la trypsine, cependant l'action tryptique est sans effet sur les membranes internes.

L'action protéolytique de la trypsine accroit considérablement l'activité des mitoplastes soniqués (+ 204 %) et faiblement celle des membranes internes soniquées (+ 43,8 %)

Particules mitoplas- tiques	Activités des enzymes en nmoles/mn/mg protéines					
	ATPase	: Effet de la trypsine	: Cytochrome oxydase	: Effet de la trypsine	: Succinate cyt. c réductase	: Effet de la trypsine
MP	248	:	:	:	:	:
MPST	408	: + 64,5 %	:	: - 5,6 %	:	: + 50 %
MPS	420	:	:	:	:	:
MPST	604	: + 43,8 %	:	: + 8 %	:	: +204 %

TABLEAU IX - Hydrolyse ménagée des particules mitoplastiques

Après l'hydrolyse par la trypsine (Difco) selon la méthode de Juntti et al (34), les activités enzymatiques sont dosées dans les conditions décrites dans la partie expérimentale.

Particules membra- naires	Activités en nmoles/mn/mg protéines					
	ATPase	: Effet de la trypsine	: Cytochrome oxydase	: Effet de la trypsine	: Succinate cyt.c réductase	: Effet de la trypsine
MI	588	:	:	:	:	:
MIT	600	: + 2 %	:	: - 72,2 %	:	: 0 %
MIS	601	:	:	:	:	:
MIST	804	: + 33,8%	:	: -57,6 %	:	: + 43,8 %

TABLEAU X - Hydrolyse ménagée des particules de membranes internes soniquées (MIS) ou non (MI), traitées à la trypsine ou non.

L'hydrolyse par la trypsine est réalisée selon la méthode de Juntti et al (34)

DEUXIEME CHAPITRE

ACTIVITE DU COMPLEXE O.S.ATPase ISOLE

DES MITOCHONDRIES DE COEUR DE PORC

A L'AIDE DE DETERGENTS

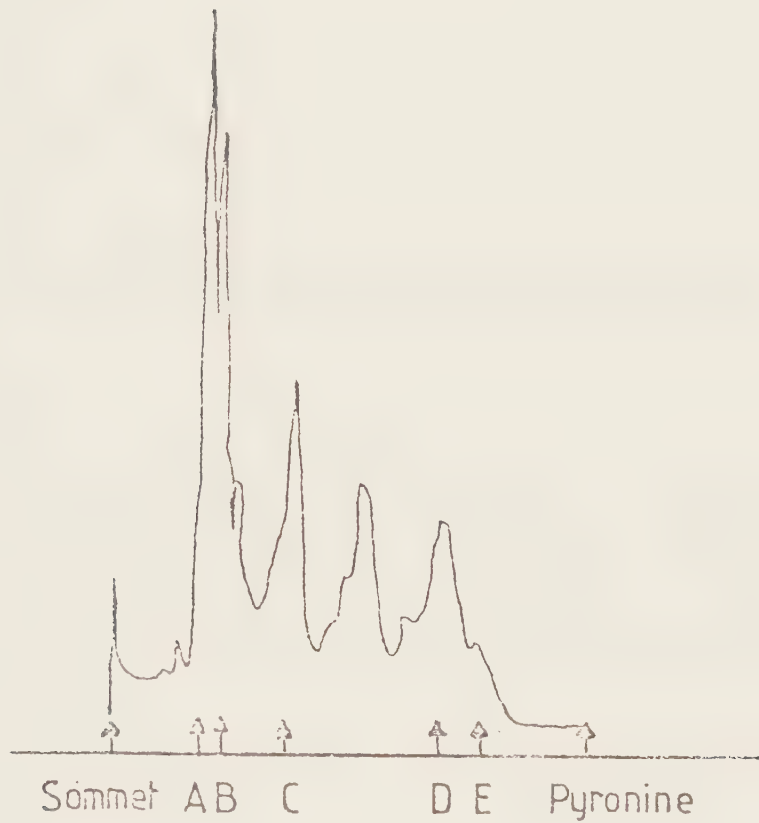
Sur- nageant	volume en ml	Proté- ines mg/ml	Proté- ines totales mg	Activité ATPasique en μ moles/ mn/ml - oligo + oligo.		Activité totale	% d'inhi- bition/ oligo.	
Sur- nageant Triton 0,2 %	10	0,20	2,00	0,02	0,02	0,01	0,2	0
Sur- nageant Triton 0,5 %	10	0,32	3,25	0,5	0,05	1,5	5	90
Sur- nageant Triton 2 %	10	0,50	5,00	1	0,2	2	10	80

TABLEAU XI - Activité de l'O.S.ATPase des mitochondries de coeur de porc cliniquement normal.

Le surnageant Triton 0,2 % contient 5 mg d'O.S. ATPase dont l'activité totale est de 10 μ moles/mn/ml. Dans le même surnageant, l'inactivation de l'enzyme par l'oligomycine est de 80 % dans nos conditions d'extraction.

FIGURE 8

TRITON 0,2 %

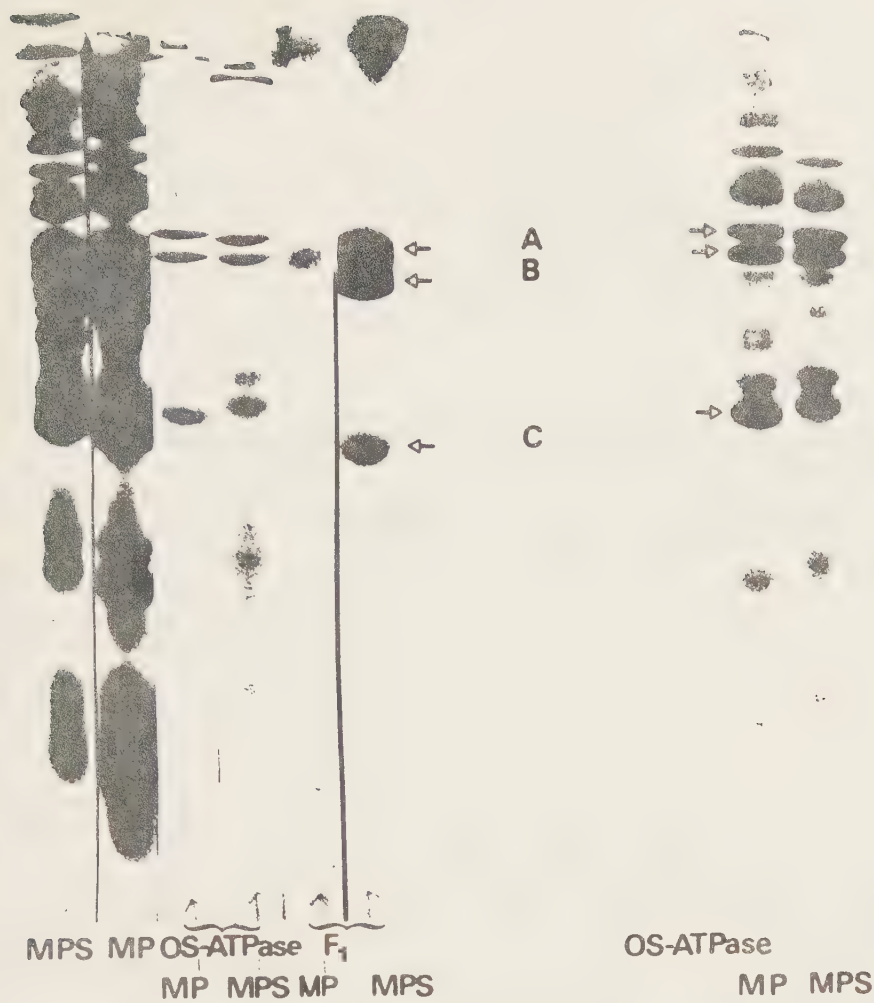


GEL D'ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS DE L'O₂S.ATPase ISOLEE
DES MITOCHONDRIES DE COEUR DE PORC NORMAL

GELS D'ELECTROPHORESE DES F_1 ET DES O.S. ATPases

Les ATPases- F_1 ou les F_1 et les O.S. ATPases sont extraites des mitoplastes normaux et soniqués par les techniques décrites dans la partie expérimentale. Les gels d'électrophorèse de la figure (9) montrent les trois bandes caractéristiques de F_1 obtenues des MP et des MPS (mitoplastes soniqués ou non) et mettent en évidence les dix bandes protéiques des O.S. ATPases isolées des mêmes échantillons mitoplastiques. Nos préparations sont donc nettement enrichies en F_1 et en O.S. ATPases.

FIGURE 9



Gels d'électrophorèse en présence de SDS des mitoplastes (95 µg), des mitoplastes soniqués (91 µg), d'OS-ATPase préparée à partir de mitoplastes (18 µg) et de mitoplastes soniqués (20 µg), de F₁-MP (18 µg) et de F₁-MPS (44 µg).

A B C représentent les bandes de F₁ de poids moléculaire ≈ 59 000, 55 000, 29 000.

F₁-MP

F₁-MPS

TROISIEME CHAPITRE

ORGANISATION DE L'ATPase SENSIBLE A L'OLIGOMYCINE ISOLEE

DE COEURS DE PORCS CLINIQUEMENT NORMAUX.

Nous avons déjà décrit le protocole expérimental (75) qui nous a servi pour étudier l'effet de la protéolyse due à la trypsine sur l'activité ATPasique.

Les fractions membranaires sont d'abord soumises à l'action de différentes concentrations en trypsine pendant des temps d'incubation bien déterminés, et ensuite l'activité ATPasique est mesurée par la méthode spectrophotométrique.

I- Modifications de l'activité ATPasique et de la sensibilité à l'oligomycine des mitoplastes et des mitoplastes soniqués

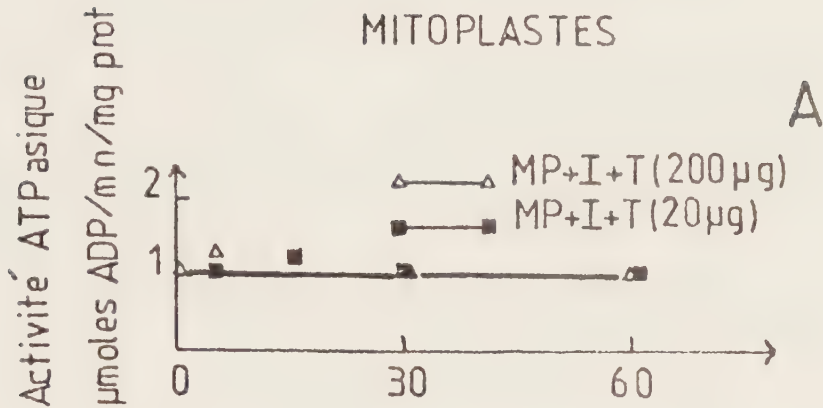
Mitoplastes = MP

Avec 2 μ g et 20 μ g de trypsine par mg de protéine, il ne se produit aucune modification de l'activité ATPasique des mitoplastes. Voir Figure 10 B

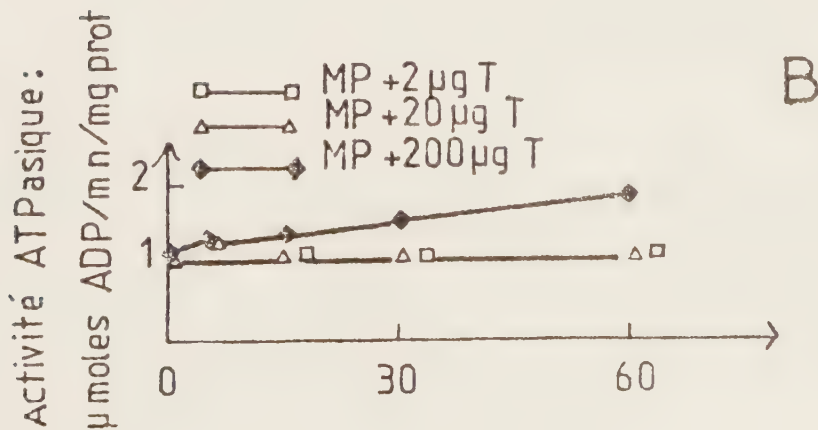
Avec 200 μ g de trypsine par mg de protéine, l'activité augmente considérablement au bout de 30 minutes d'incubation. Elle s'élève encore mais légèrement jusqu'à l'arrêt de la réaction.

Pour chaque cas, le contrôle est réalisé en présence de la trypsine et de son inhibiteur comme nous l'avons exposé précédemment.

FIGURE 10

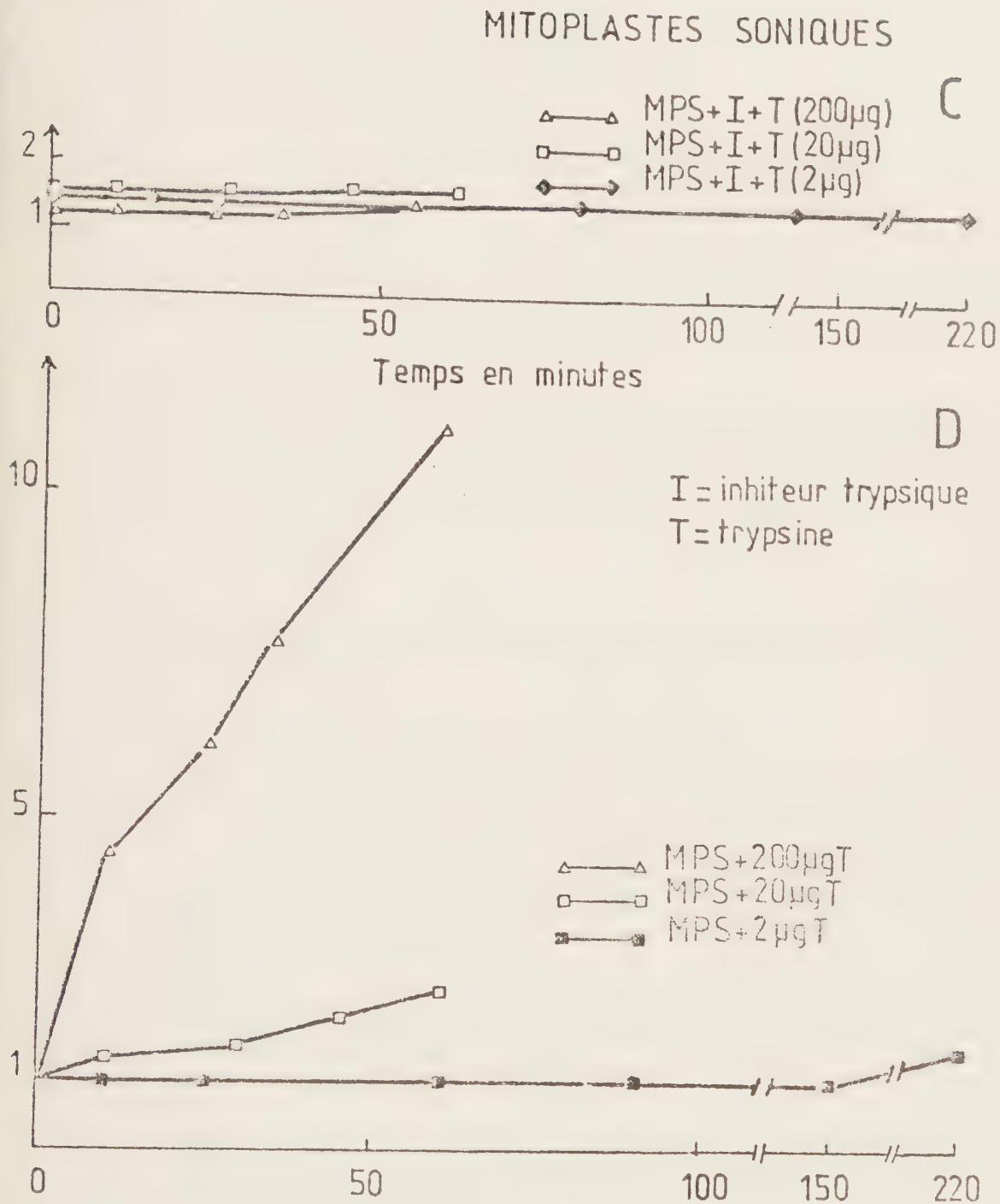


Les mitoplastes 1 mg/ml sont hydrolysés à 30° C en présence de 3 concentrations de trypsine. Les témoins contiennent de plus l'inhibiteur de la trypsine en concentration 5 fois plus forte. Activité ATPasique dosée au spectrophotomètre.



CINETIQUE D'ACTION DE LA TRYPSINE (SIGMA)
SUR LES MITOPLASTES

FIGURE 11



CINETIQUE D'ACTION DE LA TRYPSINE (SIGMA)
SUR LES MITOPLASTES SONIQUES

- La figure (10 A) illustre trois droites représentant les contrôles.

Mitoplastes soniqués = MPS

- En présence de la plus faible concentration en trypsine 2 μ g par mg de protéine, l'activité ATPasique des mitoplastes soniqués (MPS) ne subit aucune modification qu'au bout de 220 minutes d'hydrolyse. Figure 11 D

- En présence de 20 μ g de trypsine par mg de protéine, les mitoplastes soniqués voient leur activité multipliée par 2,5 fois après un temps d'hydrolyse de 60 minutes. Cette activité s'élève nettement avec une solution de trypsine cent fois plus concentrée. (Figure 11 D)

Les trois droites (Figure 11 C) correspondent aux contrôles réalisés dans les mêmes conditions que pour les mitoplastes.

Nous avons également étudié la sensibilité à l'oligomycine de l'ATPase des particules mitoplastiques (MP et MPS) en présence des trois concentrations de trypsine.

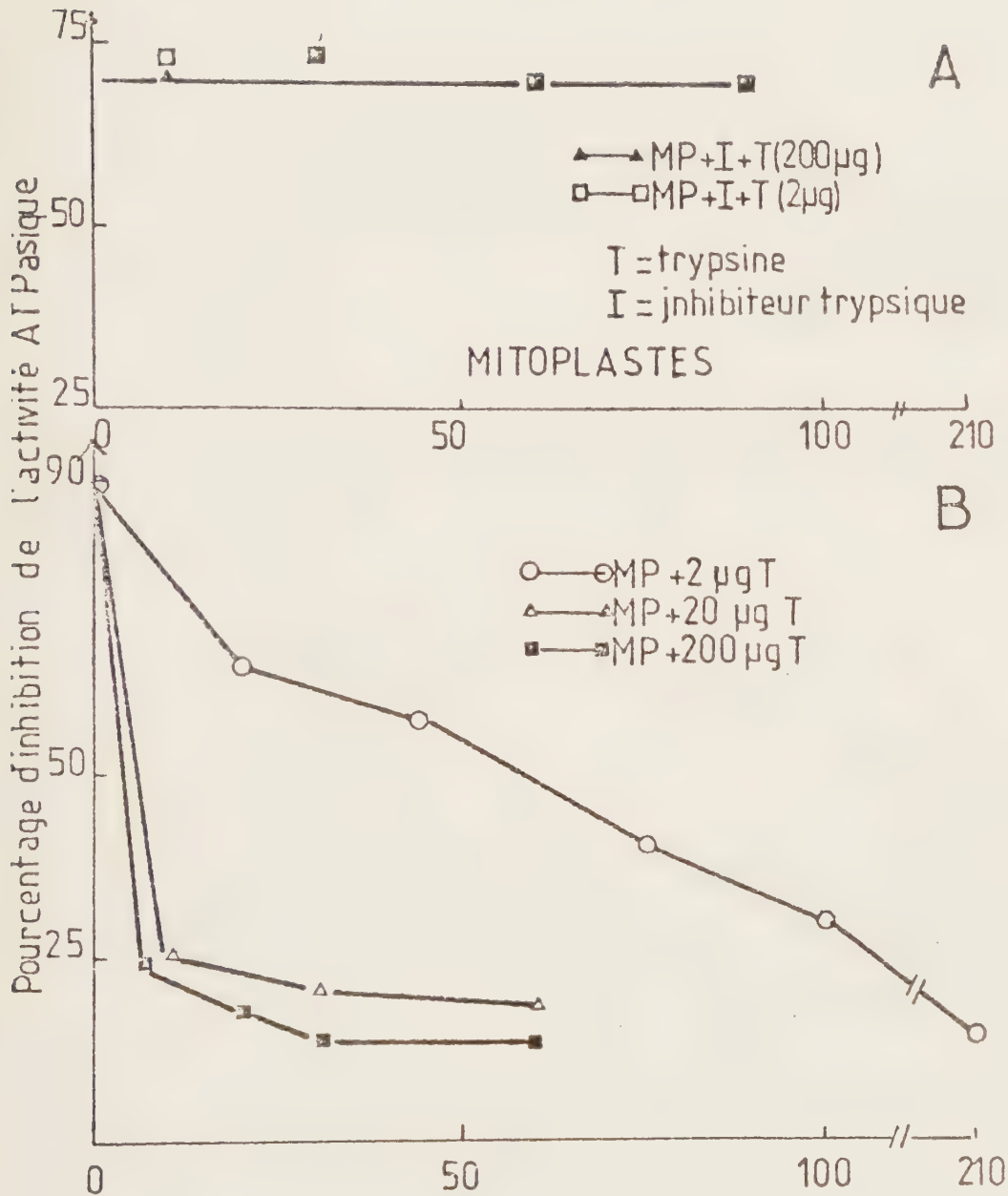
Pour les mitoplastes, l'hydrolyse par 2 μ g de trypsine par mg de protéine entraîne une inhibition de l'activité ATPasique par l'oligomycine de 90 à 15 % en 210 minutes. Figure 12 B

Par contre, cette inhibition tombe brutalement dans les dix premières minutes avec les 20 μ g et 200 μ g de trypsine. Figure 12 B.

Dans les mitoplastes soniqués, l'action protéolytique de 2 μ g de trypsine ne modifie pas d'une manière significative la sensibilité de l'ATPase vis à vis de l'oligomycine. Avec une concentration de 200 μ g, il se produit la même chute brutale de la sensibilité à l'oligomycine pendant le même temps comme dans le cas des mitoplastes. Figure 13 D

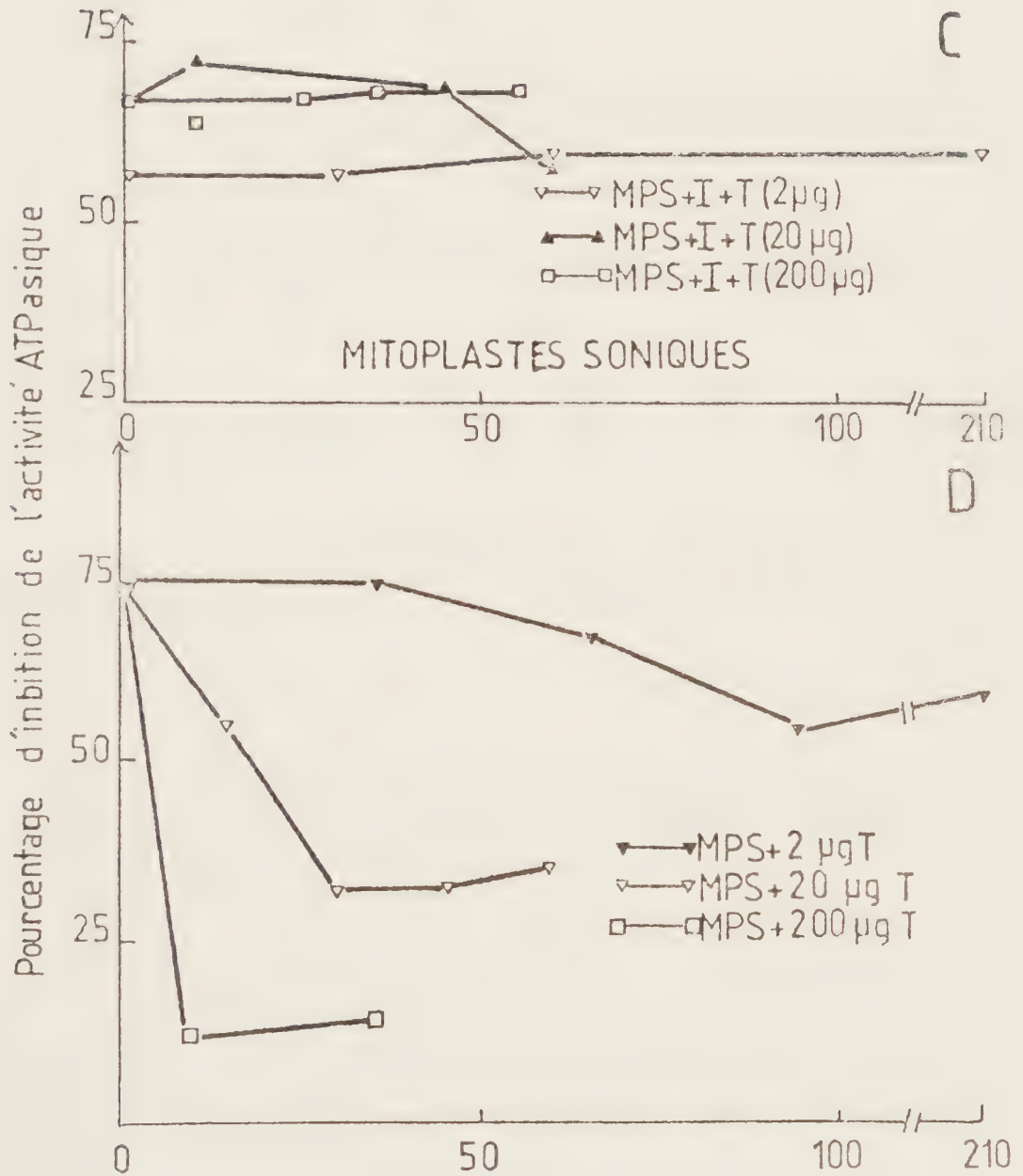
Les Figures 12 A et 13 C représentent les contrôles .

FIGURE 12



INHIBITION DE L'ATPase PAR L'OLIGOMYCINE DES MITOPLASTES
EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION EN TRYPSINE (SIGMA).

FIGURE 13



INHIBITION DE L'ATPase PAR L'OLIGOMYCINE DES MITOPLASTES SONIQUES EN
FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION EN TRYPSINE (SIGMA)

II- Modifications de l'activité ATPasique et de la sensibilité à l'oligomycine de l'O.S. ATPase.

(Figure 14)

- Les concentrations de trypsine testées sur l'O.S. ATPase préparée des mitochondries de coeur de porc cliniquement sain sont 1 μ g, 10 μ g et 100 μ g par mg de protéine.

- L'activité de l'enzyme isolée est stimulée par 1 μ g de trypsine par ml et atteint son seuil au bout de 60 minutes d'hydrolyse.

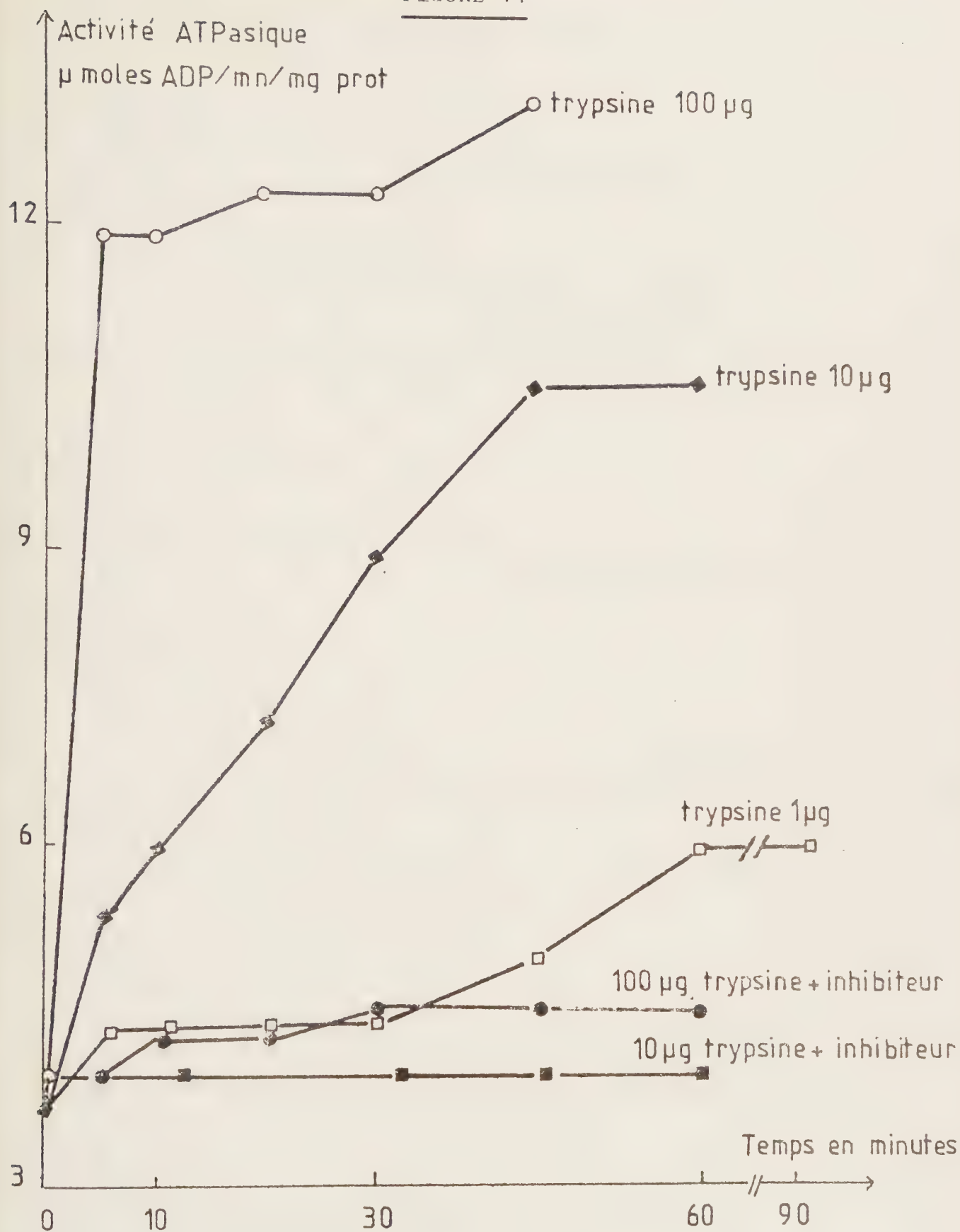
- Avec 10 μ g de trypsine par ml, l'activité ATPasique double au bout de 25 minutes et la réaction se stabilise après 45 minutes.

- Avec 100 μ g par ml, l'activité ATPasique triple au bout de 10 minutes d'hydrolyse, et augmente encore légèrement jusqu'à 45 minutes d'incubation.

Les activités ATPasiques en présence de deux concentrations de trypsine (1 μ g et 10 μ g) et des concentrations correspondantes en inhibiteur de la trypsine ne subissent aucune variation. En revanche, avec la plus forte concentration, on observe une légère hausse

(Figure 15)

Le pourcentage d'inhibition par l'oligomycine varie de 80 % à 25 % environ dans tous les cas, mais ce dernier pourcentage est atteint en 30 minutes avec la plus faible concentration en trypsine (1 μ g /mg de protéines) et en 15 minutes avec 10 μ g de trypsine.



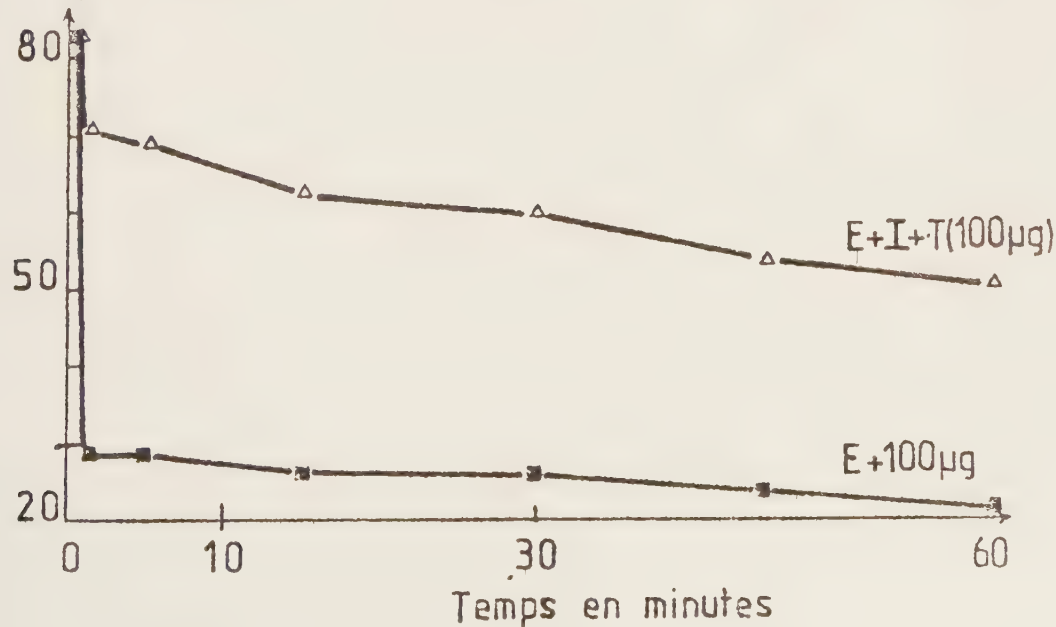
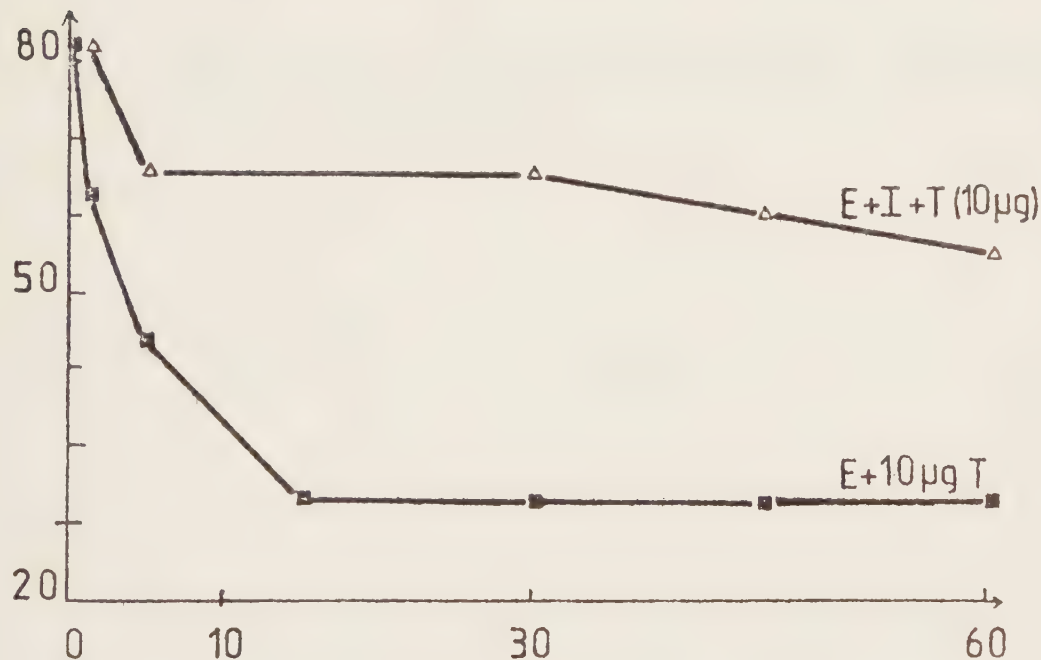
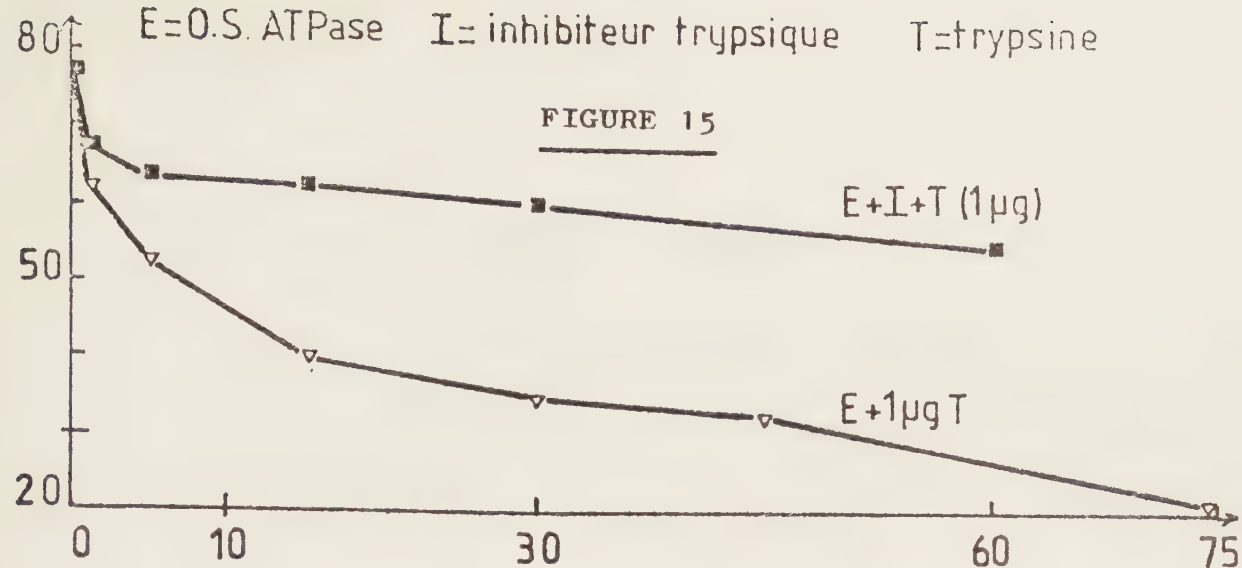
ACTION DE LA TRYPSINE SUR L'ACTIVITÉ DE L'O.S.ATPASE

L'extrait Triton 0,2 % (O.S.ATPase) contenant 0,28 mg de protéines/ml est hydrolysé à 30° C en présence de trois concentrations de trypsine (1 μg/ml, 10 μg/ml et 100 μg/ml). Les témoins sont effectués en présence des mêmes concentrations de trypsine et d'inhibiteur de trypsine en concentration cinq fois plus forte. Activité ATPasique dosée au spectrophotomètre.

E=O.S. ATPase I=inhibiteur trypsique T=trypsine

FIGURE 15

Pourcentage d'inhibition par l'oligomycine



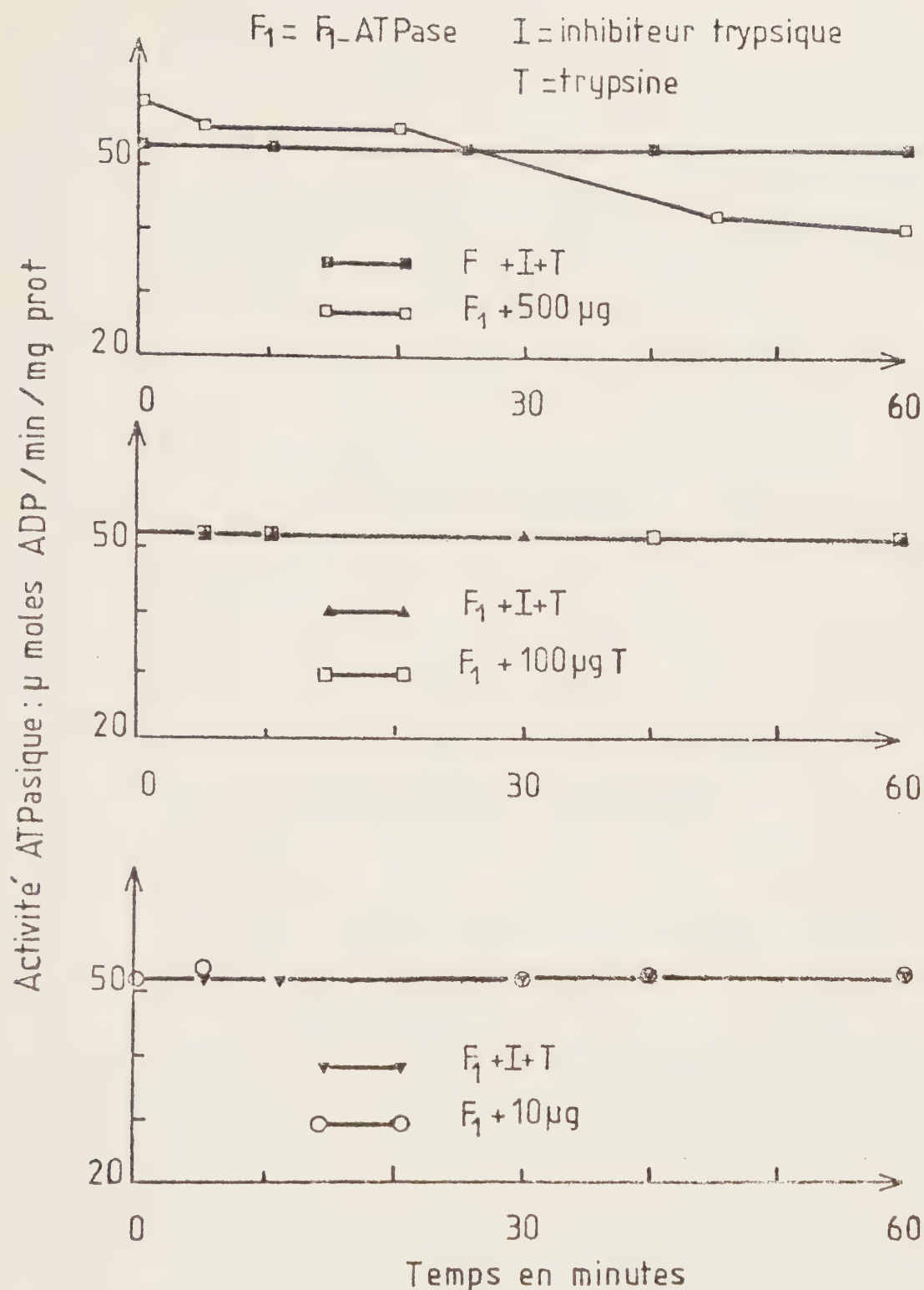
CINÉTIQUES D'INHIBITION DE L'O.S.ATPASE PAR L'OLIGOMYCINE
EN PRÉSENCE DE CONCENTRATIONS CROISSANTES EN TRYPSINE.

III - Modification de l'activité ATPasique de l'ATPase- F_1 :

Dans les limites de concentration que nous avons utilisée jusqu'à présent, la trypsine n'a aucun effet sur l'activité ATPasique du facteur F_1 . La figure 16 schématise ces résultats. Si la concentration en trypsine est multipliée par cinq (500 μ g par ml) on peut néanmoins observer une diminution de l'activité ATPasique, cet effet étant parfaitement éliminé par la présence de l'inhibiteur de la trypsine.

Nous n'avons pas étudié les variations de la sensibilité à l'oligomycine du facteur F_1 , puisqu'il n'est pas sensible à cet inhibiteur.

---o0o---



ACTION DE LA TRYPSINE SUR L'ACTIVITÉ ATPASIQUE DE F_1

F_1 (0,9 mg protéines/ml) est hydrolysé dans du tampon phosphate 0,2 M, EDTA 5 mM, pH 7,5 à 30° C en présence de trois concentrations de trypsine (10 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$ et 500 $\mu g/ml$). Des témoins sont effectués dans les mêmes conditions en présence de concentrations cinq fois plus élevées en inhibiteur de trypsine. On suit en fonction du temps l'activité ATPasique sur des aliquotes de 2 μl par dosage spectrophotométrique.

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

Après isolement, extraction et purification de la membrane mitochondriale interne de coeurs de porcs normaux, le problème de l'orientation de ces membranes se posait. Selon Racker (81), la sonication induirait l'inversion des membranes.

- La sonication est donc la première méthode d'approche pour essayer de modifier l'orientation de la membrane mitochondriale.

De nombreux auteurs comme Muscatello et Carafoli (82), Racker et coll (83), ont démontré que le site de fixation du cytochrome c est localisé du côté cytoplasmique de la membrane mitochondriale. Cette propriété nous a guidés pour déterminer la polarité préférentielle des membranes internes et des mitoplastes isolés.

Rappelons tout d'abord que le cytochrome c peut se décrocher facilement de son site par divers traitements :

- traitement hypotonique
- centrifugations
- sonication

Or ces différents traitements ont été appliqués pour préparer les mitoplastes, les membranes internes et les particules membranaires soniquées.

Les effets du cytochrome c résumés dans le tableau (VII) sur l'oxydation de NADH par les mitoplastes et les membranes soniqués ou non ont montré qu'il y a une stimulation de la NADH-oxydase par le cytochrome c dans les mitoplastes. Après sonication des mitoplastes, il n'y a aucune stimulation par le cytochrome c :

- * Le cytochrome c n'est plus accessible à son site physiologique, donc toutes les particules mitoplastiques soniquées sont inversées.

Ces résultats obtenus dans plusieurs expériences et avec des préparations différentes confirment l'emplacement superficiel du cytochrome c et l'orientation des mitoplastes physiologiquement normaux.

Par contre, nous observons la même stimulation par le cytochrome c dans les membranes internes (MI) et dans les membranes internes soniquées. Ces résultats se comprennent si les membranes sont à moitié orientées dans un sens, à moitié orientées dans l'autre.

* Les membranes internes préparées ne sont donc pas dans un état homogène.

- La seconde méthode d'approche pour l'étude de la topographie de la membrane interne est l'hydrolyse par la trypsine dans les conditions décrites par Juntti et Ernster (34). L'action protéolytique ménagée que l'on a utilisée attaque les protéines exposées à la surface de l'une des faces de la membrane. Nous avons noté dans les résultats (Tableau VIII) que :

- * L'activité NADH-oxydase est annulée après une hydrolyse ménagée par la trypsine des mitoplastes et des membranes internes soniquées ou non.
- * Puisque l'addition du cytochrome c aux mitoplastes soniqués ou non restaure l'activité de NADH-oxydase on peut penser que seuls les sites du cytochrome c ont été hydrolysés par la trypsine, mais on ne peut exclure que des constituants de la NADH-oxydase ne soient affectés.
- * Avec les membranes internes, le même effet du cytochrome c est encore observé qu'il y ait sonication ou non. Ceci constitue un critère supplémentaire que nos membranes internes ne sont pas dans un état homogène.

Si ces résultats suggèrent qu'une grande partie des sites de NADH-oxydase semblent orientés du côté matriciel comme l'affirment Juntti et Ernster (34), ils indiquent néanmoins que des composantes de ce système sont accessibles sur la face externe.

Cette conclusion est en accord avec les résultats récents de Packer (84) qui a montré que la NADH-oxydase des mitochondries de foie de rat peut être inhibée par 2 sortes de marqueurs :

le DABS = diazobenzene sulfonate :



qui est uniquement accessible à la membrane du côté cytoplasmique.

le PMPS = Paramercuryphenylsulfonate :



qui est, lui, accessible uniquement du côté matriciel.

Pour les mitochondries de coeurs de porcs cliniquement normaux, la sonication et l'hydrolyse par la trypsine nous ont permis d'orienter la membrane interne en localisant d'autres enzymes (Tableaux IX et X)

- * la cytochrome-oxydase est localisée au sein de la membrane interne. Klingenberg et Von Jagow, (36), par emploi d'un accepteur artificiel d'électrons (le ferricyanure), Schnaitman et Grenawalt ont eux aussi défini la situation profonde de la cytochrome oxydase.
- * la succinate-cytochrome c - réductase occupe une position relativement interne dans la membrane mitochondriale.

Un dernier argument concernant l'orientation de la membrane nous a été fourni par l'étude de l'ATPase. L'activité de l'ATPase est plus importante dans les mitoplastes soniqués que dans les mitoplastes normaux. Cette activité est encore stimulée par la trypsine dans les mitoplastes soniqués (Tableaux IX et X)

- * F_1 -ATPase est donc naturellement orientée du côté matriciel où elle est plus accessible à son substrat et à l'action de la trypsine.

Ce résultat s'accorde avec celui de Racker (59) qui a déterminé la localisation de F_1 -ATPase du côté matriciel par utilisation anticorps anti- F_1

- Pour étudier la topographie du complexe ATPasique dans la membrane mitochondriale, nous avons donc utilisé les mitoplastes qui ont la même orientation que les mitochondries in situ et les mitoplastes soniqués dont nous venons de démontrer le changement de polarité

● Position de l'inhibiteur protéique de F_1 -ATPase

La trypsine stimule considérablement l'activité ATPasique dans les mitoplastes soniqués tandis que son effet sur les mitoplastes normaux est très faible (Figure 11). Cette augmentation d'activité est attendue dans le cas des mitoplastes soniqués où F_1 -ATPase est plus accessible comme nous venons de le prouver. Mais pour interpréter convenablement cette hausse, il convient de rappeler les travaux :

de Pullman et Monroy (53) qui ont isolé un inhibiteur protéique de F_1 -ATPase des mitochondries de coeur de boeuf. De P.M. 15.000, il est très sensible à l'action trypsique.

de Racker, d'autre part, qui a montré que la trypsine peut multiplier par dix l'activité ATPasique des particules submitochondriales préparées par sonication

nos résultats peuvent donc s'expliquer par une hydrolyse ou un décrochage de l'inhibiteur protéique de l'ATPase par la trypsine dans les mitoplastes soniqués.

Au contraire, l'inhibiteur protéique n'est pas accessible à l'action de la trypsine dans le cas des mitoplastes (Figure 10).

On peut donc conclure que :

- * La protéine de Pullman et Monroy est fixée sur F_1 qui est orientée du côté matriciel.
- * La trypsine stimule fortement l'activité ATPasique de l'O.S. ATPase (Figure 14). L'inhibiteur protéique doit donc être présent sur cette enzyme préparée selon nos conditions que nous avons mises au point (75).

* L'activité ATPasique du facteur F_1 préparée selon la méthode de Senior et Brooks (73) n'est pas affectée par l'action de la trypsine à moins d'ajouter des concentrations énormes de trypsine = 0,5 mg par mg protéine. Dans ce cas là, on observe une perte d'activité ATPasique (Figure 16).

* Ceci signifie que le facteur F_1 est dépourvu de son inhibiteur.

• Localisation des polypeptides sensibles à l'oligomycine

On a noté les faits suivants :

* L'attaque par la trypsine diminue plus rapidement la sensibilité à l'oligomycine dans le cas des mitoplastes que dans celui des mitoplastes soniqués (Figures 12 et 13)

* F_1 - ATPase est insensible à l'oligomycine. Par conséquent, la sensibilité à l'oligomycine provient d'un peptide appartenant au facteur membranaire. Puisque les mitoplastes perdent plus facilement par hydrolyse à la trypsine leur sensibilité à l'oligomycine, ceci signifie que ce peptide membranaire est plus accessible à la trypsine du côté cytoplasmique de la membrane interne que du côté matriciel.

* Racker (85) n'observe pas non plus de perte de sensibilité à l'oligomycine des particules submitochondriales par action de 3 μ g de trypsine par mg protéine pendant 30 minutes. Nos conditions d'expérience sont voisines de celles de Racker, nous avons hydrolysé les mitoplastes et les mitoplastes soniqués avec 2 μ g trypsine par mg protéine, Nos résultats concordent avec ceux de cet auteur.

- A partir de ces résultats il est possible de faire quelques hypothèses nouvelles ou complémentaires sur la pathogénie des myopathies métaboliques :

Il est admis que la carence en vitamine E et en sélénium agit directement sur les acides gras insaturés, ensuite les peroxydes qui se forment exercent une action toxique sur les enzymes de la chaîne respiratoire.

A l'examen de nos résultats, les enzymes de la membrane mitochondriale pourraient être, eux-aussi, directement touchées, par les carences en vitamine E et en sélénium. C'est dire que ces deux facteurs anti-oxydants seraient des composés redox s'opposant à l'oxydation des protéines de la membrane.

* Par sa position externe, le cytochrome c pourrait être altéré par l'absence des anti-oxydants et l'enzyme qui ne serait plus fonctionnelle serait la NADH-oxydase qui capte les électrons venant du cytochrome c dans les conditions physiologiques normales et dont les composantes sont accessibles sur la face externe.

* La cytochrome-oxydase est enfouie au sein de la membrane interne, en cas de carence, elle ne serait inactive que lorsque la myopathie est déjà à un stade avancé.

* En revanche, le facteur membranaire de l'O.S. ATPase serait la première cible si un jeune animal est insuffisamment alimenté en vitamine E et en sélénium. Un approvisionnement insuffisant en ces éléments agirait sur le peptide impliqué dans la sensibilité à l'oligomycine : l'activité ATPasique étant inhibée et l'animal ne pourrait pas faire face à la demande d'un effort musculaire et il apparaîtrait des lésions.

* Nous avons vu que l'ATPase - F_1 est orientée du côté matriciel, elle est donc dans une position plus profonde et sa structure interne ne pourrait être modifiée qu'à un stade plus tardif. D'autre part l'ATPase- F_1 est dépourvue de lipides (47,48,49), il n'y a donc pas possibilité de formation de peroxydes dont l'action toxique retentit et sur l'organisation et sur l'activité enzymatiques.

* Il est permis de penser que les carences en vitamine E et en sélénium pourraient modifier aussi bien et en même temps la structure des phospholipides que celle des enzymes de la chaîne respiratoire.

Il faudrait maintenant vérifier ces hypothèses sur des animaux atteints de myopathies métaboliques.

Les résultats expérimentaux présentés dans cette thèse ont été exposés dans :

- une publication : "LOCATION OF PROTEIN(S) INVOLVED IN OLIGOMYCIN-INDUCED INHIBITION OF MITOCHONDRIAL ATPase NEAR THE OUTER SURFACE OF THE INNER MEMBRANE"

Hammou Maïrouch and Catherine Godinot. PNAS :
Proceedings of the National Academy of Sciences
U.S.A (Biochimistry)

- une communication :

"STRUCTURAL ORGANIZATION OF OLIGOMYCIN-SENSITIVE
ATPase IN PIG HEART MITOCHONDRIAL INNER-MEMBRANE

D.C. Gautheron, H. Maïrouch & C. Godinot.

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MEMBRANE BIONERGETICS
SPETSAI - GREECE -10-15 July 1977.

Cette communication a fait l'objet :

- d'une publication dans le livre :

"Proceedings of the International Symposium on
Membrane Bioenergetics

Elsevier - North Holland Biomedical Press.
L. Packer, éditeur.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

On peut préparer des mitoplastes, c'est-à-dire des mitochondries débarrassées de leur membrane externe par sonication. Les mitoplastes normaux ont une polarité correspondant à celle des mitochondries intactes isolées de coeurs de Porcs cliniquement normaux.

A partir de ces fractions membranaires les localisations des enzymes suivantes ont pu être déterminées :

- la NADH-Oxydase a une partie située sur la face externe et l'autre sur la face interne de la membrane mitochondriale,

- la cytochrome-oxydase est située au sein de la membrane interne,

- la succinate-cytochrome C-réductase occupe une place relativement interne dans la membrane mitochondriale,

- l'O.S.ATPase est constituée de trois facteurs distincts :

- . le facteur F1 porteur de l'inhibiteur protéique orienté du côté matriciel,
- . un facteur faisant la liaison entre F1 et le reste du complexe ATPasique,
- . le facteur membranaire impliqué dans la sensibilité à l'oligomycine, localisé sur la face externe de la membrane interne.

Enfin, l'emplacement du cytochrome C est superficiel.

La connaissance des dispositions naturelles des enzymes étudiées le long de la chaîne respiratoire peut permettre de mieux comprendre les modes d'action et les effets en cas de carences ou de subcarences en vitamine E et Sélénium dans les myopathies d'origine nutritionnelle.

Vu :

LE DIRECTEUR

de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon.

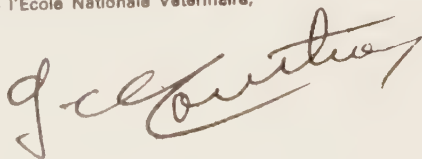


Vu :

LE DOYEN,



LE PROFESSEUR RESPONSABLE
de l'École Nationale Vétérinaire,



LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,

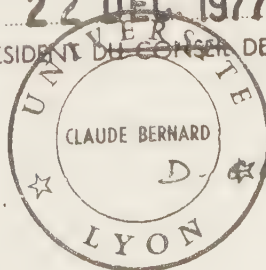


Pierre LOUISOT

Vu et permis d'imprimer.....

LYON, le 22 DEC 1977

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ DE LYON I



RESUMES DES PUBLICATIONS

S U M M A R Y

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MEMBRANE BIONERGETICS

SPETSAI - Greece - 10 - 15 July 1977

STRUCTURAL ORGANIZATION OF OLIGOMYCIN-SENSITIVE ATPase

IN PIG HEART MITOCHONDRIAL INNER-MEMBRANE

by

D.C. Gautheron, H. Maïrouch & C. Godinot

Laboratoire de Biologie et Technologie des Membranes du CNRS,
Université Claude Bernard de Lyon, 69621 - VILLEURBANNE, France.

Mitoplasts have been prepared from pig heart mitochondria by peeling off their outer membrane in hypotonic phosphate buffer ; their polarity is similar to that of intact mitochondria. Sonication induced an inversion of these mitoplasts, mainly leading to inside-out smaller vesicles, as tested by the following data : cytochrome C added to mitoplasts strongly stimulated enzymes of the respiratory chain, while it hardly affected inverted vesicles ; in contrast, trypsin treatment greatly increased the ATPase activity of inverted vesicles while it did not affect significantly the activity of right-side out mitoplasts. These results are coherent with the location of cytochrome C sites on the outside of inner membrane and with that of the very trypsin-sensitive ATPase-inhibitor on the matrix side of inner membrane.

Trypsin treatment could also abolish oligomycin sensitivity of the ATPase activity of both mitoplasts or inverted vesicles, in a more or less intense way, according to the concentration or time of action of trypsin. However, trypsin detached the soluble F_1 -ATPase from the sonicated inverted vesicles which then was recovered in the supernatant fraction. In contrast the ATPase activity remained bound to the mitoplast membranes after trypsin action. Therefore it can be concluded that the loss of oligomycin-sensitivity in sonicated inverted vesicles after trypsin action, was due to the breakage of the link between F_1 -ATPase and its membrane. On the other hand, the effect of trypsin on mitoplasts must come from the digestion of a peptide fraction well exposed on the outer surface of the inner membrane and involved in the oligomycin-sensitivity of the ATPase-complex.

S U M M A R Y

LOCATION OF PROTEIN(S) INVOLVED IN OLIGOMYCIN-INDUCED

INHIBITION OF MITOCHONDRIAL ATPase

NEAR THE OUTER SURFACE OF THE INNER MEMBRANE

by
Hammou Maïrouch and Catherine Godinot.

Laboratoire de Biologie et Technologie des Membranes du CNRS,
Université Claude Bernard de Lyon, 69621 - VILLEURBANNE, France.

Mitoplasts, that is mitochondria freed from their outer membranes, were prepared from pig heart. Sonication induced an inversion of these mitoplasts giving inside out vesicles. Indeed, added cytochrome c can be bound much better to mitoplasts than to sonicated vesicles ; secondly, addition of trypsin increased ATPase activity of sonicated vesicles without significantly affecting that of the mitoplasts. As the site of fixation of cytochrome c was located on the outer side of the inner mitochondrial membrane and as the protein inhibitor of the mitochondrial ATPase is present on the inner face of the inner membrane and is very sensitive to trypsin, it can be concluded that mitoplasts are mainly oriented as normal mitochondria while sonicated vesicles are mainly inverted.

Trypsin treatment can abolish the oligomycin sensitivity of ATPase activity of either mitoplasts or sonicated vesicles, but trypsin induced the solubilization of the soluble F_1 -ATPase of sonicated vesicles while the ATPase activity remained with the mitoplasts after trypsin action. Therefore, trypsin destroyed the oligomycin effect by rupturing the liaison between F_1 and the membrane in sonicated vesicles. On the other hand, the effect of trypsin on mitoplast must be attributed to the hydrolysis of a protein located near the outer surface of the inner membrane at least structurally involved in the oligomycin sensitivity of the ATPase complex.

PRINCIPALES ABREVIATIONS

Enzymes :

ATPase	: Enzyme catalysant l'hydrolyse de l'ATP (EC 3.6.1.3)
F ₁	: Facteur soluble extrait de l'ATPase mitochondriale
O.S.ATPase	: ATPase sensible à l'oligomycine
MAO	: Monoamine oxydase (EC 1.4.3.4)
MDH	: Malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37)

Nucléotides :

ADP-ATP	: Adénosines di, triphosphate
NAD-NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée et forme réduite.
FAD	: Flavine Adénine dinucléotide.

Particules :

SMP	: Particules submitochondriales
ETP	: "Electron transport particles" = SMP
MP	: Mitoplastes
MPS	: Mitoplastes soniqués
MPT	: Mitoplastes traités à la trypsine
MPST	: Mitoplastes soniqués et traités à la trypsine

MI	: Membranes internes
MIS	: Membranes internes soniquées
MIT	: Membranes internes traitées à la trypsine
MIST	: Membranes internes soniquées et traitées à la trypsine
F ₁ -MP	: F ₁ -ATPase préparée à partir des mitoplastes
F ₁ -MPS	: F ₁ -ATPase préparée à partir des mitoplastes soniqués
O.S.ATPase-MP	: O.S. ATPase extraite des mitoplastes
O.S. ATPase-MPS	: O.S. ATPase extraite des mitoplastes soniqués.
Cyt. c	: Cytochrome c

Tampons

Tris	: Tris (hydroxyméthyl)-amino-méthane
TEA	: Tampon Tris-H ₂ SO ₄ 40mM - EDTA 1 mM - ATP 2 mM, pH 7,5

Autres produits

OAA	: Oxaloacétate
Pi	: phosphate minéral
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique
TCA	: Acide trichloracétique
2,4-DNP	: 2,4-Dinitrophénol
DCCD	: Dicyclohexyl carbodiimide
SDS	: Dodécyl sulfate de sodium
TEMED	: N,N,N',N' - tétraméthylène diamine
DEAE Sephadex	: Diéthylaminoéthyl Sephadex

Abréviations diverses

rpm	: rotation par minute
PM	: poids moléculaire
g	: centrifuge (valeur donnée au fond du tube).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - COTTEREAU, Ph, et PROY. J.C. (1965) - Les myopathies métaboliques non inflammatoires des veaux, des agneaux et des porcs - cahiers de Médecine Vétérinaire, 34, 39-73.
- 2 - CAMERON. B.F., AZZAM. S.A., KOTITE. L and AWARD F. (1965) - Determination of myoglobin and hemoglobin - J. Lab. Clin. Méd. 5, 883
- 3 - RIGDON. R.H. (1961) Spontaneous muscular dystrophy in the white pekin duck. AM. J. Path, 39, 27-40.
- 4 - DRY (J.) et PRADALIER (A.) (1973) - Les anti-oxydants ont-ils une place en thérapeutique ? Revue Pratn., 23, 59, 5263-5268.
- 5 - ALLEN, W.M. et coll. - (1975) - Degenerative myopathy with myoglobinuria in yearling cattle ; Br. vet. J., 131, 3, 292-308
- 6 - COMBS G.F. Jr. et SCOTT M.L. (1974) - Dietary requirements for vitamin E and selenium measured at the cellular level in the chick ; j. Nutrition, 104, 1292-1296.
- 7 - JENKINS. K.J. et coll (1974) - Prevention of Nutritional Muscular Dystrophy in Calves and Lambs by selenium and Vitamine E - Additions to the Maternal Mineral Supplement ; Can. J. Anim. Sci., 54, 49-60.
- 8 - TONTIS, A. et MARTIG, J. (1974) - Zum Vorkommen der enzootischen Muskeldystrophie bei Lämmern im Kanton Bern ; Schweiz. Arch. Tierheilk, 116, 329-337.
- 9 - NIYO. Y. et GLOCK. R.D. (1976) - Selenium, vitamine E shots thwart lesions in trials ; cité par KENDALL. J.D. - Feedstuffs, 48, N° 37,22.
- 10 - TAPPEL A.L., (1973) - Lipid peroxydation to cell components - Fedn. Proc, 32, 1870-1874.
- 11 - FERRANDO R., (1975)- utilisation digestive, métabolisme et incidences pathologiques des vitamines A, O, E chez les Ruminants- dans les Minéraux et les Vitamines, Tome II - le Point vétérinaire - 12 - 15.

- 12 - FERRANDO-R. - le problème des Vitamines en alimentation animale - la relativité des Besoins. E N V Alfort 4-6
- 13 - BERTRAND M., COTTEREAU Ph, LOUISOT P, MAGAT A., MOUTHON. G et WOLTER. R. (1975). L'avitaminose E - Revue de Médecine Vétérinaire 717-730.
- 14 - FAUREAU B., (1975), Vitamine E : étude de la subcarence chez le pintadeau, thèse de Doctorat Vétérinaire - Lyon.
- 15 - NAIR P.P. (1972), Vitamin E and me tabolic Regulation and its role in cellular metabolism. Annals New-York Acad. Sci 203, 53
- 16 - Anonyme (1973) Feedstuffs, 45, 19, 78
- 17 - WOLTER. R. (1975), - les minéraux et les Vitamines, Tome II - Le Point Vétérinaire 120-123
- 18 - ROTRUCK. J.T., et coll (1973) - Selenium : Biochemical role as a component of glutathione peroxidase - Science, 179, (4073), 588-590
- 19 - FERRANDO R., (1974), Rev. I.A.A., 1, 41
- 20 - FLACHAT. Ch; VAN HAVERBEKE. G, CHANTEGRELET. G, et DUFFOUR. C. (1967) dégénérescence musculaire des jeunes bovins précoces - Rev. Méd. Vet. 30, 864-882
- 21 - PERIGAUD S., LAMAND M., BELLANGER J., RICHET M., (1975) - Les acquisitions récentes sur les carences en oligo-éléments du sol aux Ruminants 14-31.
- 22 - LAMAND M., (1968) - Fatigue musculaire et myopathie chez les jeunes ruminants - cahiers de Médecine Vétérinaire, 3, 89-101.
- 23 - ALLEN. W.M. et coll. (1975) - Degenerative myopathy with myopathy with myoglobinuria in yearling cattle. Br. Vet. J. ; 131, 3, 292-308.

- 24 - MAGAT A. (1971) Aspects Biochimiques des myopathies des animaux domestiques Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. comparée (Lyon). 645-662
- 25 - HENRY M., BILLON J., et HAOURA G., (1955) - Contribution à l'étude de l'acidose des viandes de porc, dites exsudatives. Rev. Patho. Gén, Comp. 669, 857-885.
- 26 - DANIELLI, J.F. and DAVSON, H.A. (1935) - A contribution of the theory of permeability of thin films - J. CELL. Comp. Physiol. 5, 495-508.
- 27 - SINGER, S.J. and NICOLSON, G.L. (1972) - the fluid mosaic model of the structure of cell membranes - Science, 175, 720-731.
- 28 - PFAFF, E. (1967) - Mitochondrial structure and compartmentation Quagliariello, E., PAPA, S. SLATER, ESC, and TAGER, J.M. eds. Adriatica Editrice, Bari 165-168
- 29 - FERNANDEZ-MORAN, H. (1962), - Cell-membrane ultrastructure. Low temperature electron microscopy and ray diffraction studies of lipoproteins components in lamellar system - Circulation., 26, 1039-1065.
- 30 - RACKER, E., TYLER, D.D., ESTOBROOK, R.W., CONOVER, T.E., PARSON D.F. and CHANCE. (1965) dans "oxidases and related redox Systems " Vol II. 1077-1101
- 31 - HARMON, H.J., HALL, J.D., CRANE, F.L. (1974) - structure of mitochondrial cristae membranes. - Biochim. Biophys. Acta, 344, 119-115.
- 32 - LEVY, M., TOURY, R., ANDRE, J. (1967) - Séparation des membranes mitochondriales - Purification et caractérisation enzymatiques de la membrane interne. - Biochim. Biophys. Acta, 135, 599-613.
- 33 - LOYTER, A. CHRISTIANSEN, R.O., STEENSLAND, H., SALTZGABER, J. and RACKER, E. (1969) - Energy - linked in translocation in submitochondrial particles Ca^{++} , accumulation in submitochondrial particles - J. Biol. Chem., 244, 4422-4427.

- 34 - JUNTTI, K., TORNDAL, U.B. and ERNSTER, L. (1970) "Electron transport and Energy conservation" 257-270.
- 35 - GUARNIERI, M., STECHMILLER, B. and LEHNINGER, A.L. (1971) J. Biol. Chem., 246, 7526-7532.
- 36 - KLINGENBERG, M. and Von JAGOW, G. (1970) "Electron Transport and Energy conservation" 281-289
- 37 - TINBERG, H.M., MELNICK, R.L., MAGUIRE, J. and PACKER, L. (1974) - Studies on mitochondrial proteins Localisations of components in the inner membranes. Labeling with diazobenzene sulfonate and none Penetrating Probe.
- 38 - PACKER, L., MEHARD, W. MEISSNER, G., WARREN, L., ZAHLER and FLEISCHER, S. (1974) - The structure role of lipides in mitochondrial and Sarcoplasmic reticulum membranes. - Biochim. Biophys. Acta, 363, 159-181.
- 39 - MELNICK, Ronald, L. and PACKER, L. (1971) - Freeze - Fracture Faces of inner and outer membranes of mitochondrial. - Biochim. Biophys. Acta, 253, 503-508.
- 40 - PACKER, L. (1973) dans "Mechanisms in Bioenergetics" (Azzone, G.F., ERNSTER, L., PAPA, S., QUAGLIARIELLO, E. and SILIPRANDI, N., Editeurs) Academic Press. 35-52.
- 41 - STEKHOVEN, F.S., WAITKUS, R.F. and VAN MOERKERK, H.T.P. (1972) - Identification of the Dicyclohexylcarbodiimide-Binding Protein in the Oligomycin - Sensitive Adenosine Triphosphatase from Bovine Heart Mitochondria - Biochemistry, 11, 1145-1149.
- 42 - HATEFI, Y. STIGALL, D.L., GALANTE, Y. and HANSTEIN, W.G. (1974) Mitochondrial ATP-Pi Exchange Complex-Biochem. Biophys. Res. Comm., 61, 313-321.
- 43 - SWANLJUNG, P. FRIGERI, L. OHLSON, K. and ERNSTER, L. (1973), - studies on the activation of purified mitochondrial ATPase by Phospholipids - Biochim. Biophys. Acta 305, 519-533.

- 44 - DAVIES, K.A. and HATEFI, Y. (1971) *Biochemistry*, 10, 2509-2524.
- 45 - OHNISHI, T., WILSON, D.F., ASAKURA, T. and CHANCE, B. (1972)
- Studies on iron-sulfur proteins in the site I region of the
respiratory chain in pigeon heart mitochondria and submitochon-
drial particles - *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 46, 1631-1638.
- 46 - HATEFI, Y. (1973) - oxidation of reduced Triphosphopyridine
nucleotide by submitochondrial particles from beef heart -
Biochem. Biophys. Res. Commun., 50, 978-983.
- 47 - SENIOR, A.E. and BROOKS, J.C., (1970) - Studies of the mito-
chondrial Oligomycin-Insensitive ATPase. I an improved method
of purification and the behavior of the enzyme in solutions of
various depolymerizing agents - *Arch. Biochem. Biophys.* 140,
257-266.
- 48 - SWANK, R.T., SHEIR, G.I. and MUNKRES, K.D. (1971) - Subcellular
and generic Distribution, molecular weights, and proportions of
oligopeptides - *Biochemistry*, 10, 3931-3939.
- 49 - DI PIETRO, A., GODINOT, C., BOUILLANT, M.L. and GAUTHERON,
D..C (1975) - Pig heart mitochondrial ATPase : properties of
purified and membrane bound enzyme (effects of flavonoids)
Biochimie, 57, 959-967.
- 50 - KNOWLES, A.F. and PENEFSKY, H. (1972), - The subunit structure
of beef heart mitochondrial Adenosine Triphosphatase -
Physical and chemical properties of isolated subunits - *J. Biol.
Chem.* 247, 6624-6630.
- 51 - SENIOR, A.E. (1973), The structure of mitochondrial ATPase
Biochim. Biophys. Acta, 801, 249-277.
- 52 - PEDERSEN, P.L. - mitochondrial Adenosine Triphosphatase -
(1975) *Bioenergetics*, 6, 243-275.
- 53 - PULLMAN, M.E., MONROY, G.C. (1963), -A naturally occuring inhi-
bitor of mitochondrial Adenosine Triphosphatase - *J. Biol. Chem*
238, 3762-3769.

- 54 - HORSTMAN, L.L. and RACKER, E. (1970) - Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. XXII Interaction between mitochondrial Adenosine Triphosphatase inhibitor and mitochondrial Adenosine triphosphatase. - J. Biol. Chem. 245, 1336-1344.
- 55 - RACKER, E. (1963) in Energy-linked functions of mitochondria, B. Chance, Ed., Acad. Press, New-York, p. 75.
- 56 - CATTELL, K.J., LINDOP, C.R., KNIGHT, I.G. and BEECH (1971) - the identification of the site of action of NN'-Dicyclohexylcarbodi-imide as a proteolipid in mitochondrial membranes - Biochem. J., 125, 169-177.
- 57 - ABRAMS, A. and BARON, C. (1970), - Inhibitory action of carbodiimides on bacterial membrane ATPase - Biochem. Biophys. Res. Comm. 41, 858-863.
- 58 - RACKER, E. (1970) - The two faces of the inner mitochondrial membrane - dans "Essays in Biochemistry" (de Campbell) P.N. et Dickens, F., eds.) Academic Press, vol. 6, 1-22.
- 59 - RACKER, E., BURSTEIN, C., LOYTER, A. and CHRISTIANSEN, R.O. (1970) "Electron Transport and Energy conservation", 235-252.
- 60 - LANDRY, Y., GOFFEAU, A. (1975) - Physiological and genetic modifications of the expression of the yeast mitochondrial Adenosine Triphosphatase Inhibitor - Biochim. Biophys. Acta, 376, 470-484.
- 61 - GRIFFITHS, D.E. and HOUGHTON, R.L., (1974) - Studies on energy linked reactions : modified mitochondrial ATPase of Oligomycin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Eur. J. Biochem. 46, 157-167.
- 62 - CRIDDLE, R.S. BOCK, R.M., GREEN, D.E. and TISDALE, H. (1962) - Physical characteristics of proteins of the electron Transport system and interpretation of the structure of the mitochondrial Biochemistry, 1, 827-833.

- 63 - GODINOT, C. VIAL, C., FONT, B. (1969) - Régulation de l'activité respiratoire des mitochondries de coeur de porc et transformation des nucléotides adényliques et du phosphate - Eur. J. Biochem. 8, 285-394.
- 64 - CHANCE, B. and WILLIAMS, G.R. (1956) Adv. Enzymol. 17, 65-134.
- 65 - MAISTERRENA, B., J. COMTE and GAUTHERON, D.C. (1974) - Purification of Pig Heart mitochondrial membranes Enzymatic and morphological characterization as compared to microsomes - Biochim. Biophys. Acta. 367, 115-126.
- 66 - PARSONS, D.F. WILLIAMS, G.R., CHANCE, B. (1966) - characteristics of isolated and purified preparations of the outer and inner membranes of mitochondria - Ann. N.Y. Acad. Sci. 137, 643-666.
- 67 - TABOR, C.W., TABOR, H., ROSENTHAL, S.M. (1955) - Amine oxidases
A. Amine oxidase from steer plasma $RCH_2NH_2 + O_2 \rightleftharpoons RCHO + H_2O_2$
N H₂ - Methods in Enzymology, Vol. 2, Academic Press, New York. 390-393.
- 68 - OCHOA, S. (1955) - Malic dehydrogenase from pig heart
L-Malate + DPN⁺ $\rightleftharpoons$ Oxalacétate + DPNH + H⁺ - Methods in Enzymology, Vol. I Academic Press New York, 735-739
- 69 - SOTTOCASA, G.L., KULENSTIERNA, B., ERNSTER, L., BERGSIRAND (1967), - An electron transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study - J. Cell, Biol., 32, 415-438.
- 70 - FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y. (1925) - A colorimetric determination of Phosphorus - J. Biol. Chem. 66, 375-400.
- 71 - VIAL, C., (1971) thèse de Doctorat de Spécialité - Lyon -
- 72 - PULLMAN, M.E., PENEFSKY, H.S., DATTA, A. and RACKER, E. (1960) - Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol stimulated Adenosine Triphosphatase. - J. Biol. Chem., 235, 3322-3329.

- 73 - SENIOR, A.E. and BROOKS, J.C. (1970) - Studies of the mitochondrial oligomycin-Insensitive ATPase. I. An improved method of purification and the behavior of the enzyme in solutions of Various depolymerizing agents - Arch. Biochem. Biochem. Biophys 140, 257-266
- 74 - BRUNI, A. and BIGON, E. (1974) - Diphosphatidylglycerol induced changes in the organization of mitochondrial ATPase - Biochim. Biophys. Acta, 357, 333-343.
- 75 - MAIROUCH, H., 1976 - Organisation du complexe ATPase-ATP-Synthase dans la membrane mitochondriale interne de coeur de porc - thèse de Doctorat de Spécialité. Lyon.
- 76 - MAHLER, H.R. and EUGENE, H.C. (1967) dans "Biological Chemistry" Harper Internat. ed. 76.
- 77 - GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. and DAVID, M.M. (1949) - Determination of serum proteins by means of the biuret reaction - J. Biol. Chem. 177, 751-766.
- 78 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., (1951), - Protein measurement with the folin phenol reagent - J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 79 - WEBER, K. and OSBORN, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
- 80 - CATTERALL, W.A. and PEDERSEN, P.L. (1971) - Adenosine Triphosphatase from rat liver mitochondria. I. Purification, homogeneity, and principal properties - J. Biol. Chem., 246, 4987-4991.
- 81 - RACKER, E. (1970) in Membranes of Mitochondria and chloroplasts. Racker, E. Ed. Washington, D.C. American Chemical Society, ACS Monograph 165, 164.
- 82 - MUSCATELLO, u. and CARAFOLI, E. (1969) - The oxydation of exogenous and endogenous cytochrome C in mitochondria. A biochemical and ultrastructural study - J. Cell. Biol. 40, 602.

- 83 - KAGAWA, Y. and RACKER, E. (1966) - Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. X. correlation of morphology and function in submitochondrial particles - J. Biol. Chem. 241, 2415-2482.
- 84 - TINBERG, H.M. and PACKER, L. (1976) "Mitochondria, Bioenergetics, Biogenesis and Membrane structure by L. PACKER, ARMANDO-GOMEZ-PUYON - 349-366
- 85 - RACKER, E. (1962), dans "Energy linked Functions of mitochondria Ed. Britton Chance, 75-81.

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>Introduction</u>	1
Première partie : Etude bibliographique	4
<u>Premier chapitre</u> : Conservation de l'intégrité membranai- re par apport des anti-oxydants naturels = vitamine E et Sélénium.	5
I. Importance des anti-oxydants naturels sur la structure membranaire	5
II. La synergie entre la vitamine E et le sélénium	6
III. Hypothèses sur le mode d'action cellulaire du groupe vitaminique E	9
IV. Hypothèse sur le mode d'action cellulaire du sélénium	12
V. Manifestations cliniques de l'avitaminose E et de la carence en sélénium.	14
<u>Deuxième chapitre</u> : Organisation normale de la membrane mitochondriale interne.	15
I. Différents modèles de structure des membranes mitochondriales.	15
II. Moyens d'étude de l'organisation de la membrane interne	16
<u>Troisième chapitre</u> : Organisation spatiale du complexe O.S. ATPase dans la membrane mitochondriale interne.	23
I. Obtention d'ATPases sensibles à l'oligomycine (O.S. ATPases).	23
II. Les composantes fonctionnelles de l'O.S. ATPase	23
III. Disposition spatiale et morphologie de l'O.S. ATPase	26

Deuxième partie : Matériel et méthodes	50
<u>Premier chapitre</u> : Préparations et isollements des membranes mitochondriales à partir de coeurs de porcs cliniquement normaux.	31
I. Fractionnement cellulaire et isolement des mitochondries de coeur de porc.	31
II. Mesure de l'indice de contrôle respiratoire (RCR) des mitochondries isolées.	32
III. Technique de fractionnement des mitochondries de coeur de porc cliniquement normal.	35
IV. Techniques de dosage des enzymes marqueurs	39
1. Dosage de la mono-amine-oxydase (MAO) = enzyme marqueur de la membrane externe.	39
2. Dosage de la malate déshydrogénase (MDH) = enzyme marqueur matricielle	40
3. Dosage des enzymes marqueurs de la membrane interne.	40
a) NADH-oxydase	40
b) Cytochrome c - oxydase	41
c) Succinate cytochrome c-réductase	42
d) Différentes méthodes de dosage de l'activité ATPasique	43
Dosage du phosphate minéral	43
Dosage des protons libérés	44
Dosage enzymatique de l'ADP	45
V. Préparation des ETP "électron transport particles" par sonication et centrifugation différentielle.	46
<u>Deuxième chapitre</u> : A) Méthodes de solubilisation et de purification de l'ATPase	
B) Extraction du complexe O.S. ATPase des mitochondries de coeur de porc	47
A) Méthodes de solubilisation et de purification de l'ATPase	
I. Méthode de SENIOR et BROOKS	47

II. Méthode de BRUNI et BIGON adaptée aux mitoplastes et aux mitoplastes soniqués	47
---	----

B) Extraction du complexe O.S. ATPase des mitochondries de coeur de porc à l'aide de détergents	48
---	----

Troisième chapitre :

I. Hydrolyse par la trypsine en solution	49
II. Dosages des protéines	50
III. Electrophorèses sur gel de polyacrylamide	51

Troisième partie : Résultats expérimentaux

<u>Premier chapitre :</u> orientations des particules submitochondriales isolées de coeurs de porcs cliniquement normaux.	55
---	----

I. Contrôles de pureté et d'intégrité de la membrane externe	55
II. Contrôles de pureté et d'intégrité de la membrane interne	56
III. Modifications par la sonication des activités enzymatiques dans les mitoplastes et dans les membranes internes.	61
IV. Modifications par la trypsine des activités enzymatiques des mitoplastes et des membranes internes	64

Deuxième chapitre :

Activité du complexe O.S.ATPase isolé des mitochondries de coeur de porc à l'aide de détergents.	68
Gels d'électrophorèse des F_1 et des O.S.ATPases	70

<u>Troisième chapitre :</u> Organisation de l'ATPase sensible à l'oligomycine isolée de coeurs de porcs cliniquement normaux.	72.
---	-----

I. Modifications de l'activité ATPasique et de la sensibilité à l'oligomycine des mitoplastes normaux et soniqués	72
II. Modifications de l'activité ATPasique et de la sensibilité à l'oligomycine de l'O.S. ATPase	78
III. Modifications de l'activité ATPasique de l'ATPase-F ₁	81.
<u>Discussion</u>	83
<u>Conclusions</u>	91
<u>Résumés des publications</u>	93
<u>Abréviations</u>	96
<u>Références Bibliographiques</u>	99
<u>Table des matières</u>	109

